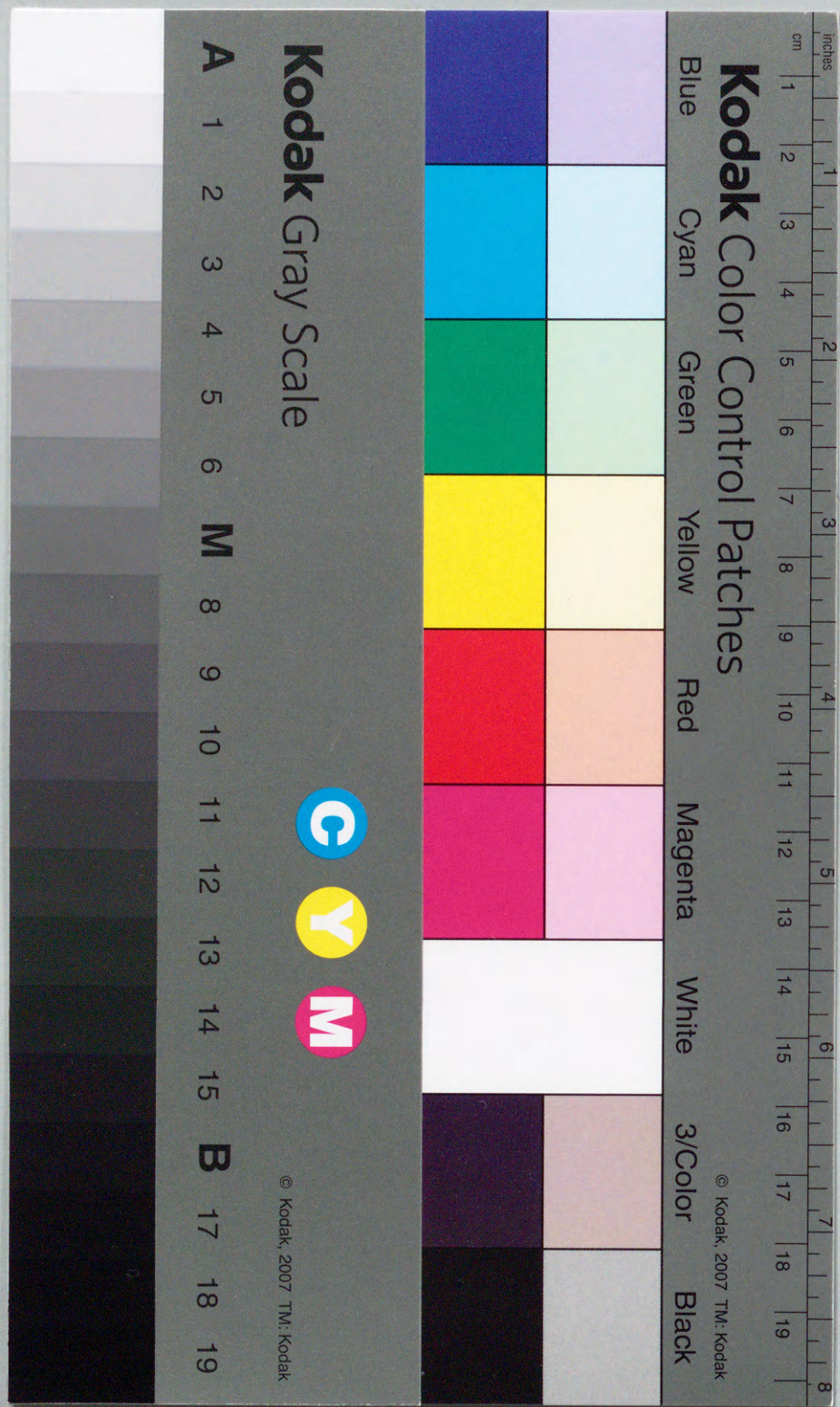


カルシウム拮抗薬の腎作用に関する薬理学的研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 高原 章 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/54333 |

カルシウム拮抗薬の腎作用に関する薬理学的研究

高原 章



本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Akira Takahara, Mizue Suzuki-Kusaba, Hiroaki Hisa and Susumu Satoh.
Effects of a novel Ca^{2+} entry blocker, CD-349, and TMB-8 on renal vasoconstriction induced by angiotensin II and vasopressin in dogs.
Journal of Cardiovascular Pharmacology 16: 966-970, 1990.
2. Akira Takahara, Aichi Ogasawara, Mizue Suzuki-Kusaba, Hiroaki Hisa and Susumu Satoh.
Natriuretic effect of TMB-8 in anaesthetized dogs.
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 18: 255-258, 1991.
3. Akira Takahara, Kohzo Yoshida, Mizue Suzuki-Kusaba, Hiroaki Hisa and Susumu Satoh.
Effects of nifedipine and TMB-8 on angiotensin II-induced mesenteric vasoconstriction in dogs.
Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 328: 288-296, 1994.
4. Akira Takahara, Hiroaki Hisa, Makoto Yoshida, Mizue Suzuki-Kusaba and Susumu Satoh.
Effects of nifedipine and TMB-8 on angiotensin II-induced antinatriuresis in anesthetized dogs.
Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 330: 309-318, 1995.
5. Akira Takahara, Hideki Dohmoto, Hiroaki Hisa, Susumu Satoh and Ryota Yoshimoto.
Cilnidipine attenuates renal nerve stimulation-induced renal vasoconstriction and antinatriuresis in anesthetized dogs.
Japanese Journal of Pharmacology 75: 27-32, 1997.
6. Hisayuki Uneyama, Akira Takahara, Hideki Dohmoto, Ryota Yoshimoto, Kazuhide Inoue and Norio Akaike.
Blockade of N-type Ca^{2+} current by cilnidipine (FRC-8653) in acutely dissociated rat sympathetic neurones.
British Journal of Pharmacology 122: 37-42, 1997.

目 次

| | |
|--|----|
| 序 章 緒 言 | 1 |
| 付 記 | 4 |
| 第 1 章 アンジオテンシン II による腎血管収縮発現における細胞内への Ca^{2+} 動員 | 5 |
| 第 1 節 アンジオテンシン II による腎血管収縮に対するカルシウム拮抗薬 CD-349 の作用 | 6 |
| 第 2 節 アンジオテンシン II による腎血管収縮に対する Ca^{2+} チャンネル活性化薬 Bay K 8644 の作用 | 8 |
| 第 3 節 アンジオテンシン II による腎血管収縮に対する細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用 | 9 |
| 第 4 節 考 察 | 12 |
| 第 2 章 アンジオテンシン II による腎および腸間膜血管収縮発現における細胞内への Ca^{2+} 動員に関する臓器差異 | 15 |
| 第 1 節 アンジオテンシン II 腸間膜動脈内投与による腸間膜血管収縮作用に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用 | 15 |
| 第 2 節 アンジオテンシン II 静脈内投与による腎および腸間膜血管収縮に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用 | 18 |
| 第 3 節 考 察 | 22 |

| | |
|--|----|
| 第 3 章 アンジオテンシン II による抗利尿発現における細胞内への Ca^{2+} 動員 | 24 |
| 第 1 節 細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の尿生成に与える影響 | 25 |
| 第 2 節 アンジオテンシン II の抗利尿作用に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用 | 27 |
| 第 3 節 腎アンジオテンシン II 受容体結合に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用 | 31 |
| 第 4 節 考 察 | 32 |
| 第 4 章 N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用を併せ持つカルシウム拮抗薬シルニジピンの腎作用 | 35 |
| 第 1 節 交感神経節細胞におけるシルニジピンの N 型 Ca^{2+} チャンネルに対する作用 | 36 |
| 第 2 節 腎交感神経刺激による腎血管収縮に対するシルニジピンの作用 | 41 |
| 第 3 節 腎交感神経刺激による抗利尿およびノルエピネフリン放出に対するシルニジピンの作用 | 43 |
| 第 4 節 考 察 | 45 |
| 第 5 章 総 括 | 48 |
| 謝 辞 | 50 |
| 引 用 文 献 | 51 |

序 章 緒 言

カルシウム拮抗薬は1980年代より抗高血圧薬として広く臨床使用されている血管拡張薬である。ベラパミルの血管拡張作用が1962年に報告されて以来、ベラパミルを用いた筋収縮に関する基礎研究が進む中でその作用機序が解析され、カルシウム拮抗薬と命名された。1970年代にはジルチアゼム、ニフェジピンが開発され、その後これら薬剤の欠点を補う形で長時間作用型のカルシウム拮抗薬が開発されてきた。現在、米国合同委員会が発表した高血圧の段階的治療法でカルシウム拮抗薬は第1選択薬の位置を占めている。カルシウム拮抗薬の作用点は細胞膜の電位依存性L型 Ca^{2+} チャンネルであり、その α_1 サブユニットに結合してチャンネルの開口確率を低下させて細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制させる。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下し、それにより血管平滑筋が弛緩して血管拡張作用が発揮される。また、カルシウム拮抗薬は心筋収縮や心臓内伝導を抑制することから、狭心症や一部の不整脈治療にも臨床応用されている。

カルシウム拮抗薬は血圧調節や高血圧発症に関連のある腎臓の機能にも影響を与え、腎血管拡張やナトリウム利尿をもたらすことが報告されている^{1,4,11,24,38})。腎機能を調節する重要な生体内因子に交感神経系やレニン-アンジオテンシン系が知られており、カルシウム拮抗薬とこれら因子の関係については临床上でも着目されている。腎交感神経の活性化により神経終末より放出されたノルエピネフリンは腎臓内のアドレナリン α_1 受容体を介して腎血管収縮や抗ナトリウム利尿を発現させ、アドレナリン β_1 受容体を介してレニンを分泌させる¹⁰)。また、レニンはアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシンIに分解し、さらにアンジオテンシン変換酵素によりアンジオテンシンIIが産生され、腎血管収縮や抗ナトリウム利尿を引き起こす。これらの生体内因子の生理作用発現には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与しており、カルシウム拮抗薬は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇機構を抑制することで腎血管拡張やナトリウム利尿などの腎作用を発揮する可能性が考えられている。

アンジオテンシンIIは強力な腎血管収縮物質であり、輸入または輸出細動脈を収縮

させることで糸球体濾過調節機構に影響を与える。また、尿細管傍血管血流を変化させることで尿細管機能に影響を与えるのと同時に、腎尿細管細胞に直接作用して尿細管で Na^+ 再吸収を促進させることが知られている³⁶⁾。このようにアンジオテンシン II は腎血行動態変化と直接または間接的な尿細管 Na^+ 再吸収促進により抗ナトリウム利尿を引き起こし、体液維持に作用している。アンジオテンシン II は細胞膜の AT_1 受容体に結合して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。その過程は単離組織や細胞を用いた *in vitro* の実験系で解析されている⁴⁴⁾。一方、細動脈や生体位腎レベルでの Ca^{2+} 動員経路に関する情報はほとんど得られていない。カルシウム拮抗薬は *in vivo* でアンジオテンシン II の腎血管収縮作用を強力に抑制する^{25,33,50)}ことから、この作用発現に細胞外からの Ca^{2+} 流入が寄与していると考えられている。しかし、その他の Ca^{2+} 動員経路の寄与ならびに血管収縮発現機構における腎血管の特異性について明確にされていない。また、アンジオテンシン II の抗ナトリウム利尿作用発現に關与する Ca^{2+} 動員経路についても不明な点が多い。

腎交感神経の活性化により神経終末から放出されたノルエピネフリンはアドレナリン α_1 受容体を介して腎血管収縮や抗ナトリウム利尿を発現させる¹⁰⁾。これらの反応における主な Ca^{2+} 動員経路は、腎交感神経性の抗ナトリウム利尿が細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 で抑制され、カルシウム拮抗薬で抑制されないことから、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離が主であることが示されている³²⁾。また、交感神経終末からのノルエピネフリン放出は電位依存性 N 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入により誘発され²⁰⁾、従来の L 型カルシウム拮抗薬ニフェジピンや TMB-8 により影響を受けない³²⁾。したがって、従来のカルシウム拮抗薬は腎交感神経伝達ならびにアドレナリン α_1 受容体刺激以降の過程を抑制し難く、神経性の腎機能調節にはほとんど影響を与えないと考えられている。近年、L 型と共に N 型チャンネルも阻害するカルシウム拮抗薬シルニジピン¹⁶⁾が開発された。この薬物は降圧に伴う反射性頻脈など交感神経活性上昇を伴う反応を抑制するという臨床上有用な特質を有している²¹⁾。腎機能調節においても、シルニジピンは神経伝達物質放出を抑制して交感神経系活性上昇時の腎循環や尿生成の変化に影響を与える可能性が想定される。

本研究ではカルシウム拮抗薬を含めた Ca^{2+} 動態に影響を与える薬物がレニン-アンジオテンシン系および腎交感神経系による腎機能調節に与える作用に焦点をあて、以下の薬理学的評価を進めた。

- ①腎血管床におけるアンジオテンシン II による血管収縮に対するカルシウム拮抗薬、 Ca^{2+} チャンネル活性化薬および細胞内カルシウム遊離阻害薬の効果
- ②腎血管床と腸間膜血管床におけるアンジオテンシン II による血管収縮に対するカルシウム拮抗薬と細胞内カルシウム遊離阻害薬の抑制効果の比較
- ③細胞内カルシウム遊離阻害薬の尿生成に与える作用およびアンジオテンシン II による抗ナトリウム利尿作用に対するカルシウム拮抗薬と細胞内カルシウム遊離阻害薬の効果
- ④カルシウム拮抗薬シルニジピンの N 型 Ca^{2+} チャンネル抑制作用と腎交感神経刺激による腎血流変化や尿排泄変化に対する効果

これら薬剤の腎作用を麻酔イヌを用いた *in vivo* 試験系で解析し、カルシウム拮抗薬の循環器用薬としての有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。

付 記

実験動物 雑種成犬をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg, i.v.にて導入後、5 mg/kg/hr, i.v.で維持) で麻酔し、人工呼吸下で実験に用いた。また、Wistar 系ラットをペントバルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p.) 投与後に神経組織を単離した。実験動物の取扱いは東北大学薬学部または味の素 (株) 中央研究所で作成された実験指針に従って実施した。

試 薬 TMB-8 (8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride, Sigma)、アンジオテンシン II およびバソプレシン (以上ペプチド研究所) は 0.9%生理食塩水に溶解してイヌに投与した。ニフェジピン (Sigma)、Bay K 8644 (バイエル薬品)、CD-349 (2-nitratopropyl-3-nitratopropyl-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophen-yl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate、大正製薬) およびシルニジピン (味の素) はエタノール: ポリエチレングリコール 400 : 0.9%生理食塩水=15 : 15 : 70 の溶媒に溶解した後に 0.9%生理食塩水で希釈して投与した。In vitro の試験では、ジルチアゼム (Sigma)、 ω -conotoxin-GVIA、 ω -conotoxin-MVIIC、 ω -agatoxin-IVA (以上ペプチド研究所) および Calciseptine (RBI) は蒸留水に溶解し、ニフェジピン、ベラパミル、フルナリジン (以上 Sigma) およびシルニジピンは dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した後に、細胞外液で目的の濃度に希釈した。DMSO は最終濃度で 0.5% 以下になるように各々調製した。

統計処理 実験値は平均値 \pm 標準誤差で示した。平均値の差の検定には Dunnett's test、Simple main effects または Scheffe's test を用い、危険率 5 % 未満を統計学的に有意差ありとした。

第 1 章 アンジオテンシン II による腎血管収縮発現における細胞内への Ca^{2+} 動員

血管平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化はその収縮反応発現に重要な役割を担っている。血管収縮物質が血管平滑筋細胞膜上の受容体に結合すると、 Ca^{2+} は Ca^{2+} チャンネルを通じた細胞外からの流入または小胞体などの Ca^{2+} 貯蔵部位からの遊離という主な 2 つの経路で供給される。強力な腎血管収縮性ペプチドであるアンジオテンシン II はラットの摘出腎灌流標本で細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存的な灌流圧の上昇を引き起こし⁹⁾、イヌ生体位腎標本でカルシウム拮抗薬のベラパミル、ジルチアゼムおよびニフェジピンがアンジオテンシン II による腎血流量減少反応を効果的に抑制することが確かめられている^{25,33,50)}。これらの事実はアンジオテンシン II による腎血管収縮は Ca チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入に依存することを示している。一方、アンジオテンシン II による腎血管収縮において、細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の関与は生体位腎標本で明確にされていない。本研究では細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を抑制する作用を持つ TMB-8⁷⁾ を用い、アンジオテンシン II による腎血流量減少反応に対する影響を麻酔犬で検討した。さらに、アンジオテンシン II の腎血管反応における Ca^{2+} チャンネルの関与を確かめるために、カルシウム拮抗薬 CD-349⁴⁷⁾ と Ca^{2+} チャンネル活性化薬 Bay K 8644⁴²⁾ の影響を検討した。血管収縮性ペプチドのバソプレシンによる腎血流量減少反応についても同様の検討を行った。

<実験方法>

1. 腎血管反応測定系の作成

麻酔下イヌの左側腹部を切開して腎動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で腎血流量を測定した。腎神経を外科的に除去し、腎動脈内へ薬液を直接投与するために、ポリエチレンチューブに接続した注射針 (25G) 2 本を腎動脈の起始部に挿入した。全身血圧は前腕動脈に挿入したカニユーレを圧トランスデューサーに接続して測定した。心拍数は心電図第 II 誘導より心拍計を介して計測した。

2. 実験群

動物をアンジオテンシン II 投与群 (3 群)、バソプレシン投与群 (3 群) および Bay K 8644 投与群 (2 群) の合計 8 群に分け、それぞれの群で CD-349、TMB-8 および Bay K 8644 の影響について検討した。

第 1 節 アンジオテンシン II による腎血管収縮に対する カルシウム拮抗薬 CD-349 の作用

<方法>

アンジオテンシン II (3、5 および 10 ng/kg、n=7)、バソプレシン (5、10 および 20 ng/kg、n=7) または Bay K 8644 (0.1、0.2 および 0.4 μ g/kg、n=6) の各用量を約 5 分間隔で腎動脈内へ注入することにより腎血流量減少作用を観察し、この反応をコントロールとした。CD-349 (0.03 μ g/kg/min) を腎動脈内に持続注入し、投与開始 10 分後より再びコントロールと同用量のアンジオテンシン II、バソプレシンまたは Bay K 8644 を腎動脈内へ注入した。さらに CD-349 の投与量を 0.1 および 0.3 μ g/kg/min に増して同様の操作を繰り返した。

<結果>

アンジオテンシン II、バソプレシンおよび Bay K 8644 の腎動脈内投与により用量依存的に腎血流量が減少した。このとき、全身血圧は変動しなかった。これらの物質による腎血流量減少反応はカルシウム拮抗薬 CD-349 により用量依存的に低下した (Fig. 1)。CD-349 を腎動脈内投与したとき、腎血流量は増加し、全身血圧は低下した (Table 1)。

Table 1. Effects of renal arterial infusion of CD-349 on systemic and renal hemodynamics

| (μ g/kg/min) | 0 | 0.03 | 0.1 | 0.3 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------------|---------------------------|
| MAP | 124 \pm 4 | 123 \pm 4 | 120 \pm 4 ^b | 112 \pm 4 ^b |
| HR | 146 \pm 8 | 145 \pm 8 | 145 \pm 8 | 147 \pm 8 |
| RBF | 183 \pm 12 | 185 \pm 13 | 193 \pm 14 | 199 \pm 15 ^b |

Values are means \pm SE (n=20). MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); RBF, renal blood flow (ml/min). ^bP<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

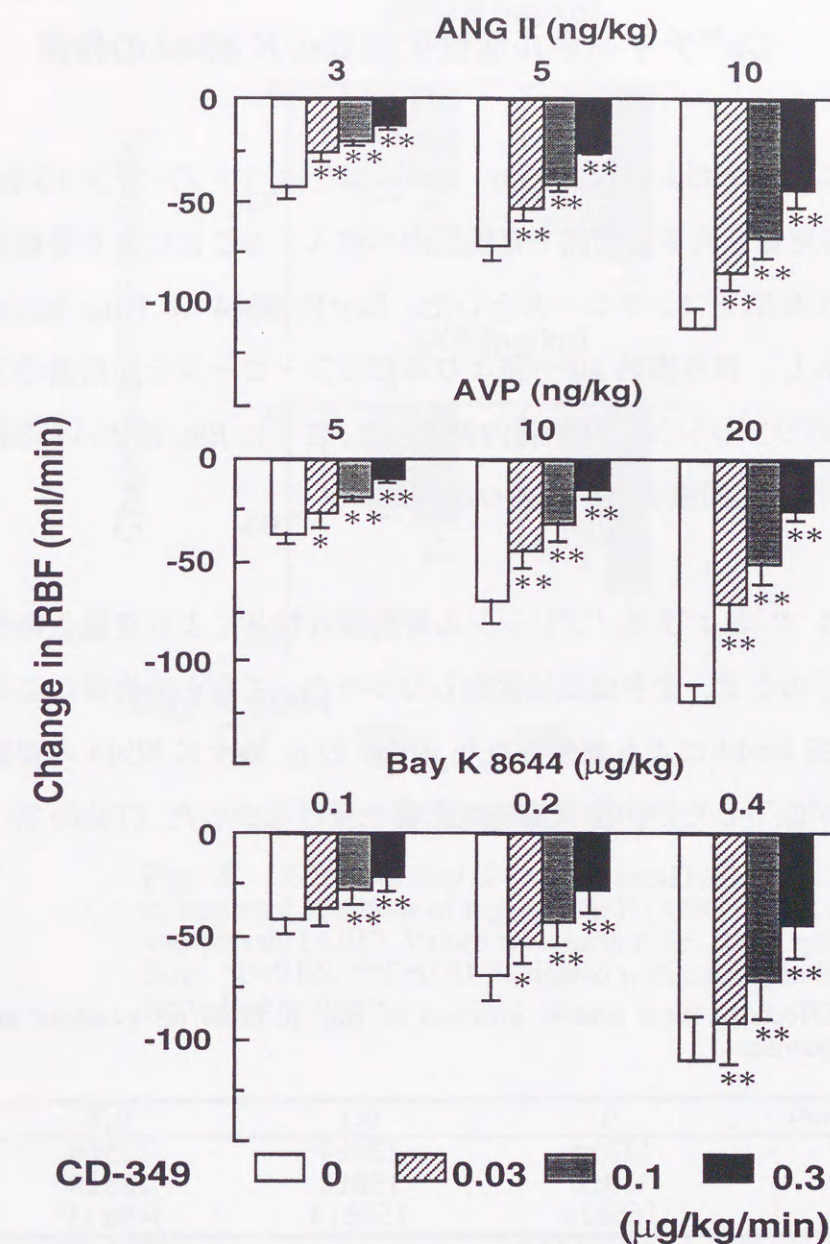


Fig. 1. Effects of CD-349 on renal blood flow responses to intrarenal injections of angiotensin II (ANG II), arg-vasopressin (AVP) and Bay K 8644. Values are means \pm SE. RBF, renal blood flow. *P<0.05, **P<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

第2節 アンジオテンシンIIによる腎血管収縮に対する Ca²⁺チャンネル活性化薬 Bay K 8644 の作用

<方法>

アンジオテンシン II (3 および 5 ng/kg, n=6) またはバソプレシン (5 および 10 ng/kg, n=6) の各用量を約 5 分間隔で腎動脈内へ注入することにより腎血流量減少作用を観察し、この反応をコントロールとした。Bay K 8644 (0.1 µg/kg/min) を腎動脈内に持続注入し、投与開始 10 分後より再びコントロールと同用量のアンジオテンシン II またはバソプレシンを腎動脈内投与した。さらに Bay K 8644 の投与量を 0.3 µg/kg/min に増して同様の操作を繰り返した。

<結果>

アンジオテンシン II およびバソプレシンの腎動脈内投与により用量依存的に腎血流量が減少した。このとき、全身血圧は変動しなかった。これらの物質による腎血流量減少反応は Bay K 8644 により増強された (Fig. 2)。Bay K 8644 の腎動脈内投与により腎血流量が低下したが、全身血圧は影響を受けなかった (Table 2)。

Table 2. Effects of renal arterial infusion of Bay K 8644 on systemic and renal hemodynamics

| (µg/kg/min) | 0 | 0.1 | 0.3 |
|-------------|--------|--------|---------------------|
| MAP | 123±5 | 124±4 | 125±4 |
| HR | 139±8 | 139±8 | 128±9 |
| RBF | 166±14 | 158±13 | 149±11 ^b |

Values are means±SE (n=12). MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); RBF, renal blood flow (ml/min). ^bP<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

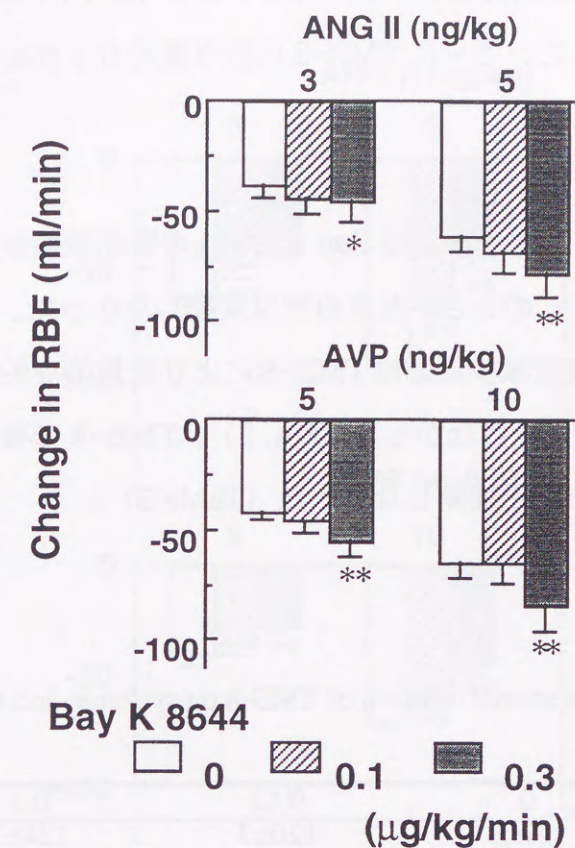


Fig. 2. Effects of Bay K 8644 on renal blood flow responses to intrarenal injections of angiotensin II (ANG II) and arg-vasopressin (AVP). Values are means ± SE. RBF, renal blood flow. *P<0.05, **P<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

第3節 アンジオテンシンIIによる腎血管収縮に対する 細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用

<方法>

アンジオテンシン II (3, 5 および 10 ng/kg, n=6)、バソプレシン (5, 10 および 20 ng/kg, n=6) または Bay K 8644 (0.1, 0.2 および 0.4 µg/kg, n=6) を約 5 分間隔で腎動脈内へ注入することにより腎血流量減少作用を観察し、この反応をコントロールとした。TMB-8 (0.03 mg/kg/min) を腎動脈内に持続注入し、投与開始

10 分後より再びコントロールと同用量のアンジオテンシン II、バソプレシンまたは Bay K 8644 を腎動脈内投与した。さらに TMB-8 の投与量を 0.1 mg/kg/min に増して同様の操作を繰り返した。

<結果>

アンジオテンシン II、バソプレシンおよび Bay K 8644 の腎動脈内投与により用量依存的に腎血流量が減少した。このとき、全身血圧は変動しなかった。アンジオテンシン II とバソプレシンの腎血流量減少反応は TMB-8 により用量依存的に抑制されたが、Bay K 8644 の反応は影響を受けなかった (Fig. 3)。TMB-8 の腎動脈内投与により腎血流量や全身血圧はほとんど変動しなかった (Table 3)。

Table 3. Effects of renal arterial infusion of TMB-8 on systemic and renal hemodynamics

| (mg/kg/min) | 0 | 0.03 | 0.1 |
|-------------|-------|-------|-------|
| MAP | 127±3 | 126±3 | 124±3 |
| HR | 139±7 | 139±8 | 135±8 |
| RBF | 174±9 | 166±9 | 163±8 |

Values are means±SE (n=18). MAP, mean arterial pressure (mmHg); HR, heart rate (beats/min); RBF, renal blood flow (ml/min).

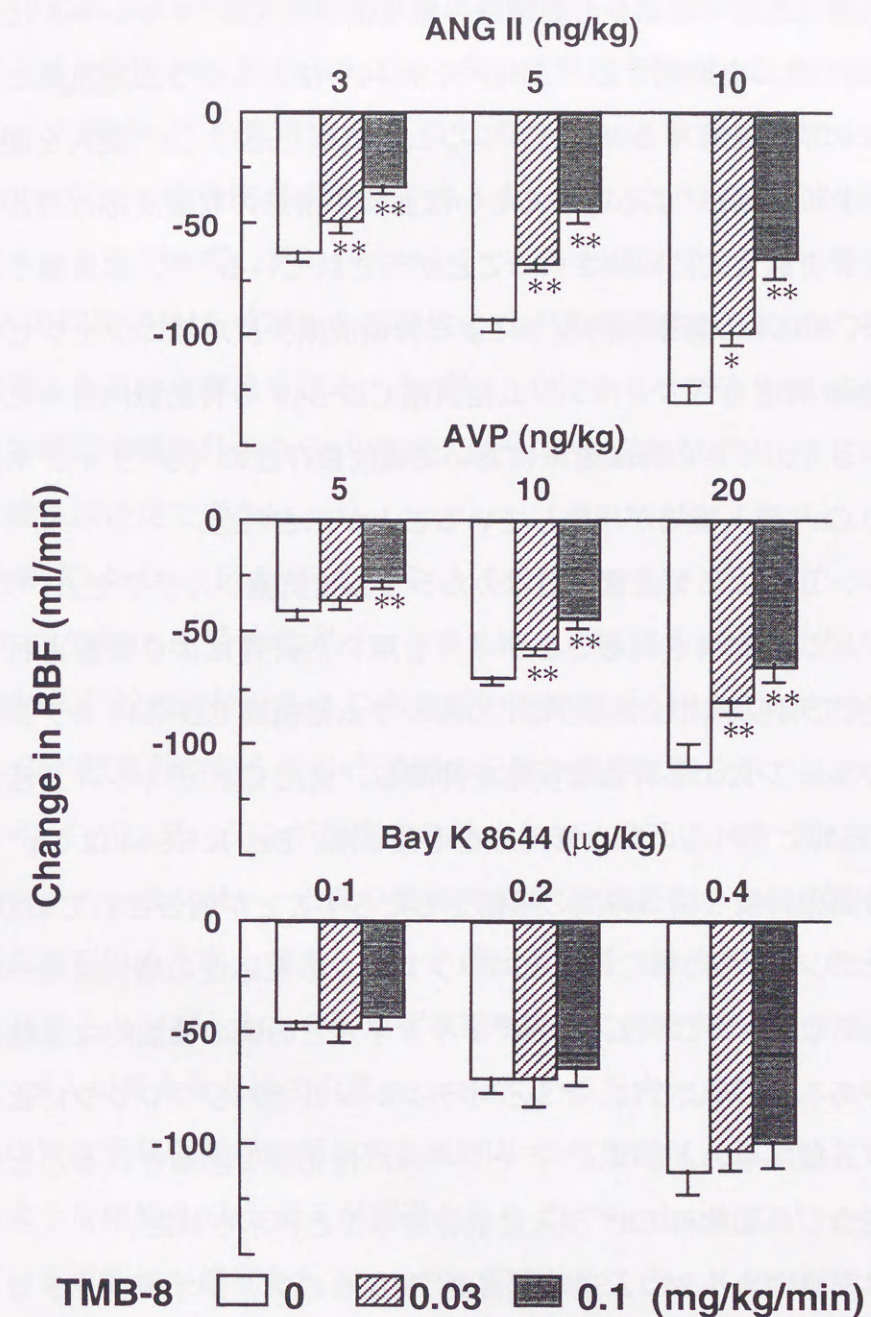


Fig. 3. Effects of TMB-8 on renal blood flow responses to intrarenal injections of angiotensin II (ANG II), arg-vasopressin (AVP) and Bay K 8644. Values are means±SE. RBF, renal blood flow. *P<0.05, **P<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

第4節 考 察

カルシウム拮抗薬は血管平滑筋や心筋細胞の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに作用して細胞外からの Ca^{2+} 流入を抑制する¹⁵⁾。Bay K 8644⁴²⁾ はカルシウム拮抗薬と同様に dihydropyridine の構造を有するが、カルシウム拮抗薬と逆に Ca^{2+} 流入を促進させる薬物である。Bay K 8644 による心筋あるいは血管平滑筋の収縮反応はカルシウム拮抗薬ニフェジピンで競合的に抑制されることが示されている^{3,42)}。本章第1節に記したように Bay K 8644 の腎動脈内投与による腎血流減少反応はニフェジピン類似の dihydropyridine 構造をもつカルシウム拮抗薬 CD-349 の腎動脈内投与により抑制された。したがって、イヌの腎血管床において電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外からの Ca^{2+} 流入機構が作動していることが示された。

アンジオテンシン II による腎血管収縮はカルシウム拮抗薬ジルチアゼム、ベラパミルおよびニフェジピンで抑制されることがイヌを用いた研究により報告されている^{25,33,50)}。本章の研究で明らかにしたように、カルシウム拮抗薬 CD-349 もアンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管反応を抑制し、また Ca^{2+} チャンネル活性化薬 Bay K 8644 は対照的にこれらの腎血管反応を増強した。Bay K 8644 は Ca^{2+} チャンネルに対し開口時間の持続と閉口時間の短縮をもたらすことが報告されており¹⁹⁾、本研究で観察されたアンジオテンシン II とバソプレシンの反応性の増大は両ペプチドにより活性化される収縮メカニズムと Ca^{2+} チャンネルとの間の機能的な連結を示唆している可能性がある。このように、アンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管収縮はカルシウム拮抗薬および Ca^{2+} チャンネル活性化薬で修飾されることから、 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} 流入に依存することが示された。

本章第3節では細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 のアンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管反応に対する影響について検討し、結果を記した。すなわち、TMB-8 はアンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管反応を用量依存的に減弱させた。TMB-8 はウサギの腓腹筋のカフェインによる筋小胞体からの $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 遊離を抑制するが⁷⁾、回腸基底膜の Ca^{2+} 流入を減少させない¹²⁾ 薬物であることから、これらペプチドの腎血管収縮作用には細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離も寄与しているこ

とが示唆された。一方、TMB-8 はウシ副腎皮質球状細胞においてアンジオテンシン II と KCl による Ca^{2+} 流入を抑制することが報告されている³⁰⁾。しかし本章に記したように TMB-8 は Bay K 8644 による腎血管反応を抑制しなかった。これは Ogawa と Ono の報告³⁴⁾ を支持する結果であり、本実験条件下において TMB-8 は dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入には作用しないことを示している。したがって、アンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管反応に対する TMB-8 の抑制効果は、TMB-8 感受性の Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を抑制したために発現したものと考えられる。ただし、これらのペプチドが dihydropyridine 非感受性の経路で細胞外から Ca^{2+} を流入させ、その経路が TMB-8 により抑制されるという可能性は否定できない。

本研究により、アンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管収縮は dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者により引き起こされることが示された。細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の正確な機序は明らかではないが、アンジオテンシン II やバソプレシンが細胞内のイノシトール三リン酸 (IP_3) を増加させ、 IP_3 がセカンドメッセンジャーとなり細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの遊離を促進させる機序が提唱されている^{5,46)}。また、ラット摘出灌流腎で灌流液中の Ca^{2+} 除去はアンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管収縮を完全に抑制することが報告され^{8,9)}、細胞外 Ca^{2+} 流入が腎血管収縮の引き金になっていると考えられる。このため、これらペプチドの腎血管収縮発現に関与する細胞内 Ca^{2+} 遊離はノルエピネフリンで報告されているような細胞外 Ca^{2+} 流入が刺激となる Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構⁴⁰⁾ が関与している可能性が推測される。一方、TMB-8 は Bay K 8644 による腎血管収縮を抑制しないため、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇のみでは Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構が作動しないものと考えられる。したがって、アンジオテンシン II やバソプレシンの受容体活性化により変動する細胞内セカンドメッセンジャーが Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release に影響を与えることが推測される。

以上の結果より、生体位腎におけるアンジオテンシン II とバソプレシンの腎血管収縮反応には dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と

TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者により引き起こされることが明らかになった。

第2章 アンジオテンシン II による腎および腸間膜血管収縮

発現における細胞内への Ca^{2+} 動員の臓器差異

第1章に記したように腎血管床ではアンジオテンシン II による腎血流減少反応は dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者により引き起こされる。しかし、他の臓器血管床でアンジオテンシン II による血管収縮反応が腎血管床で示されたものと同様な Ca^{2+} 動態を示すかどうか明らかではない。そこでアンジオテンシン II による腸間膜動脈血流減少反応に対する dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の関与をイヌで検討し、それを腎血管床と比較した。

第1節 アンジオテンシン II 腸間膜動脈内投与による腸間膜血管収縮作用に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の作用

<方法>

麻酔下イヌの左側腹部を切開して腸間膜動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で腸間膜動脈血流量を測定した。腸間膜動脈の起始部に薬液の動脈内投与用のポリエチレンチューブに接続した注射針 (25G) を2本装着した。全身血圧は前腕動脈に挿入したカニューレを圧トランスデューサーに接続して測定した。

アンジオテンシン II (5 および 10 ng/kg) をおよそ5分間隔で腸間膜動脈内に注入することにより腸間膜動脈血流量減少作用を観察し、これをコントロールとした。TMB-8 (30 $\mu\text{g/kg/min}$, $n=5$) またはニフェジピン (0.03 $\mu\text{g/kg/min}$, $n=6$) を腸間膜動脈内に持続注入し、投与開始10分後より再びコントロールと同用量のアンジオテンシン II を腸間膜動脈内に投与した。ニフェジピン投与群では薬物の投与量を 0.1、0.3 $\mu\text{g/kg/min}$ に、TMB-8 投与群では 100 $\mu\text{g/kg/min}$ に増して同様の操作を繰り返した。

<結果>

アンジオテンシン II の腸間膜動脈内投与により用量依存的に腸間膜動脈血流量が減少した。このとき全身血圧は変動しなかった。ニフェジピンまたは TMB-8 の腸間膜動脈内投与により腸間膜血流量は用量依存的に増加した (Tables 4, 5)。アンジオテンシン II による血流量減少反応は TMB-8 (30-100 $\mu\text{g/kg/min}$) により用量依存的に抑制され、ニフェジピンでは最高用量 (0.3 $\mu\text{g/kg/min}$) で僅かに抑制されたのみであった (Fig. 4)。

Table 4. Effects of intramesenteric arterial infusion of TMB-8 on basal hemodynamics

| ($\mu\text{g/kg/min}$) | 0 | 30 | 100 |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
| MAP | 128 \pm 5 | 124 \pm 5 | 125 \pm 5 |
| MBF | 136 \pm 17 | 141 \pm 21 | 176 \pm 27 ^b |

Values are means \pm SE (n=5). MAP, mean arterial pressure (mmHg); MBF, mesenteric blood flow (ml/min). ^bP<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

Table 5. Effects of intramesenteric arterial infusion of nifedipine on basal hemodynamics

| ($\mu\text{g/kg/min}$) | 0 | 0.03 | 0.1 | 0.3 |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------|
| MAP | 132 \pm 6 | 128 \pm 7 | 122 \pm 10 | 120 \pm 8 |
| MBF | 132 \pm 32 | 145 \pm 29 | 168 \pm 35 | 210 \pm 46 ^b |

Values are means \pm SE (n=6). MAP, mean arterial pressure (mmHg); MBF, mesenteric blood flow (ml/min). ^bP<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

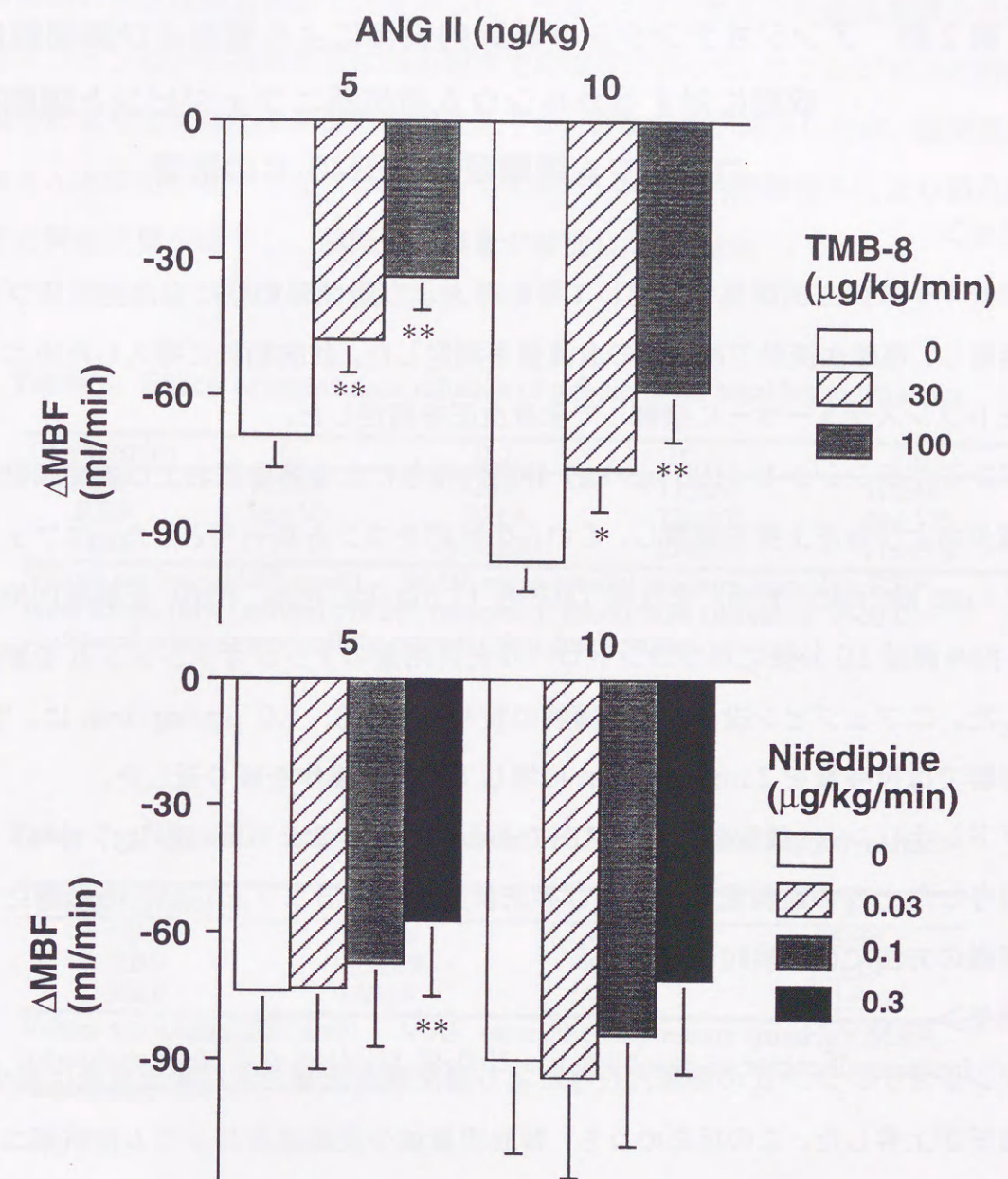


Fig. 4. Effects of intramesenteric arterial infusion of TMB-8 (n=5, upper panel) or nifedipine (n=6, lower panel) on changes in mesenteric blood flow (MBF) induced by intramesenteric arterial injections of angiotensin II (ANG II). Values are expressed as means \pm SE. *P<0.05, **P<0.01 compared to the corresponding control values (zero dose).

第2節 アンジオテンシンⅡ静脈内投与による腎および腸間膜血管収縮に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の影響

＜方法＞

麻酔下イヌの左側腹部を切開して腎動脈および腸間膜動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で両動脈の血流量を測定した。前腕動脈に挿入したカニユーレを圧トランスデューサーに接続して全身血圧を測定した。

アンジオテンシンⅡ (100 ng/kg) 静脈内投与による腎動脈および腸間膜動脈血流量減少および血圧上昇を観察し、これらの反応をコントロールとした。ニフェジピン (0.1 µg/kg/min, n=6) または TMB-8 (1 mg/kg/min, n=6) を静脈内持続注入し、投与開始 10 分後に再びコントロールと同用量のアンジオテンシンⅡを静脈内投与した。ニフェジピン投与群では薬物の投与量を 0.3、1.0 µg/kg/min に、TMB-8 投与群では投与量を 2 mg/kg/min に増して同様の操作を繰り返した。

アドレナリン α_1 受容体アゴニストであるメソキサミン (50 µg/kg, n=4) を静脈内投与したときの血流量減少および昇圧反応に対するニフェジピンの影響についても同様の方法で比較検討した。

＜結果＞

アンジオテンシンⅡの静脈内投与により腸間膜血流量および腎血流量は減少し、全身血圧が上昇した。この反応のうち、腎血流量減少反応はカルシウム拮抗薬ニフェジピンの最低用量 (0.1 µg/kg/min) から用量依存的に抑制され、腸間膜血流量減少と昇圧反応はニフェジピンの最高用量 (1.0 µg/kg/min) でのみ抑制された (Fig. 5)。TMB-8 はアンジオテンシンⅡによる腸間膜および腎血流量減少反応を用量依存的に抑制した (Fig. 6)。メソキサミンの静脈内投与は腸間膜および腎血流量を減少させ、ニフェジピン (0.1-1.0 µg/kg/min) はこの反応を用量依存的に抑制した。Fig. 7 にはコントロール時の血流減少反応に対するニフェジピンや TMB-8 による抑制率で示した。アンジオテンシンⅡによる血流量減少反応に対する TMB-8 静脈内投与による抑制の程度は腸間膜および腎血管床で同程度であったが、ニフェジピンの静脈内投与

による抑制の程度は腎血管床で大きかった。一方、メソキサミンの血流量減少反応に対するニフェジピンの抑制効果は両血管床で同程度であった。ニフェジピンの静脈内持続投与により全身血圧は用量依存的に低下し、腎血流量が減少したが、腸間膜血流量はほとんど変化しなかった (Table 6)。TMB-8 の静脈内持続投与により最高用量で血圧と腎血流量が低下し、腸間膜血流量が増加した (Table 7)。

Table 6. Effects of intravenous infusion of nifedipine on basal hemodynamics

| (µg/kg/min) | 0 | 0.1 | 0.3 | 1.0 |
|-------------|--------|--------|--------------------|--------------------|
| MAP | 128±4 | 123±3 | 115±4 ^b | 102±6 ^b |
| RBF | 86±10 | 79±9 | 73±10 ^b | 61±12 ^b |
| MBF | 117±11 | 122±10 | 124±11 | 116±16 |

Values are means±SE (n=6). MAP, mean arterial pressure (mmHg); RBF, renal blood flow (ml/min); MBF, mesenteric blood flow (ml/min). ^bP<0.01 compared with corresponding control (zero dose) values.

Table 7. Effects of intravenous infusion of TMB-8 on basal hemodynamics

| (mg/kg/min) | 0 | 1 | 2 |
|-------------|--------|--------|--------------------|
| MAP | 113±4 | 109±6 | 95±9 ^a |
| RBF | 115±19 | 99±19 | 91±19 ^a |
| MBF | 140±8 | 150±14 | 181±32 |

Values are means±SE (n=6). MAP, mean arterial pressure (mmHg); MBF, mesenteric blood flow (ml/min). ^aP<0.05 compared with corresponding control (zero dose) values.

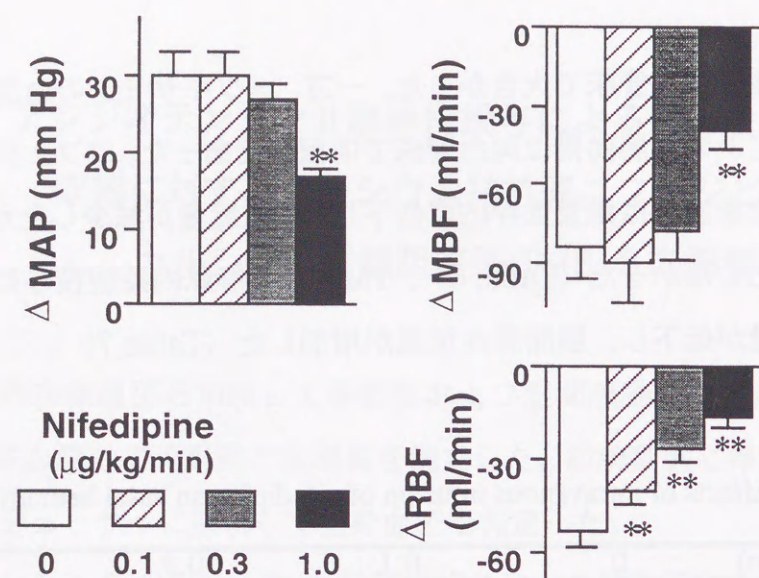


Fig. 5. Effects of i.v. infusion of nifedipine (n=6) on changes in mean arterial pressure (MAP), mesenteric blood flow (MBF) and renal blood flow (RBF) induced by i.v. injections of angiotensin II (100 ng/kg). Values are expressed as means \pm SE. **P<0.01 compared to the corresponding control values (zero dose).

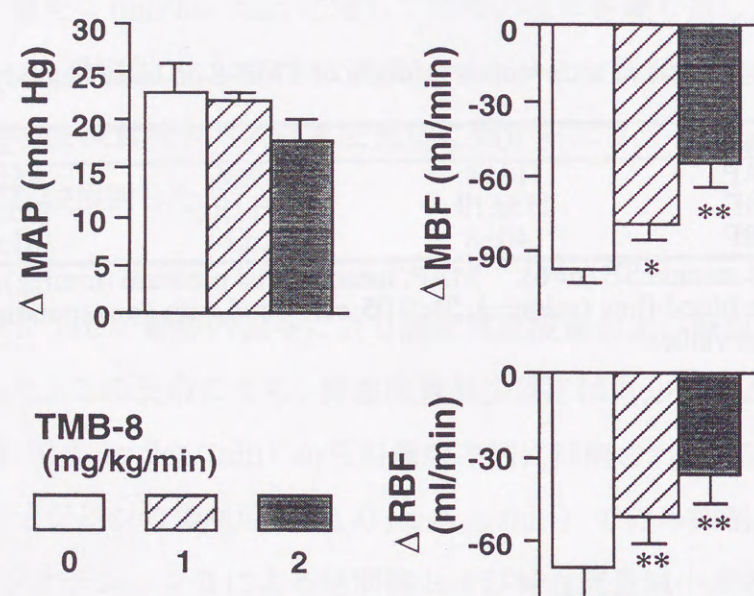


Fig. 6. Effects of i.v. infusion of TMB-8 (n=6) on changes in mean arterial pressure (MAP), mesenteric blood flow (MBF) and renal blood flow (RBF) induced by i.v. injections of angiotensin II (100 ng/kg). Values are expressed as means \pm SE. *P<0.05, **P<0.01 compared to the corresponding control values (zero dose).

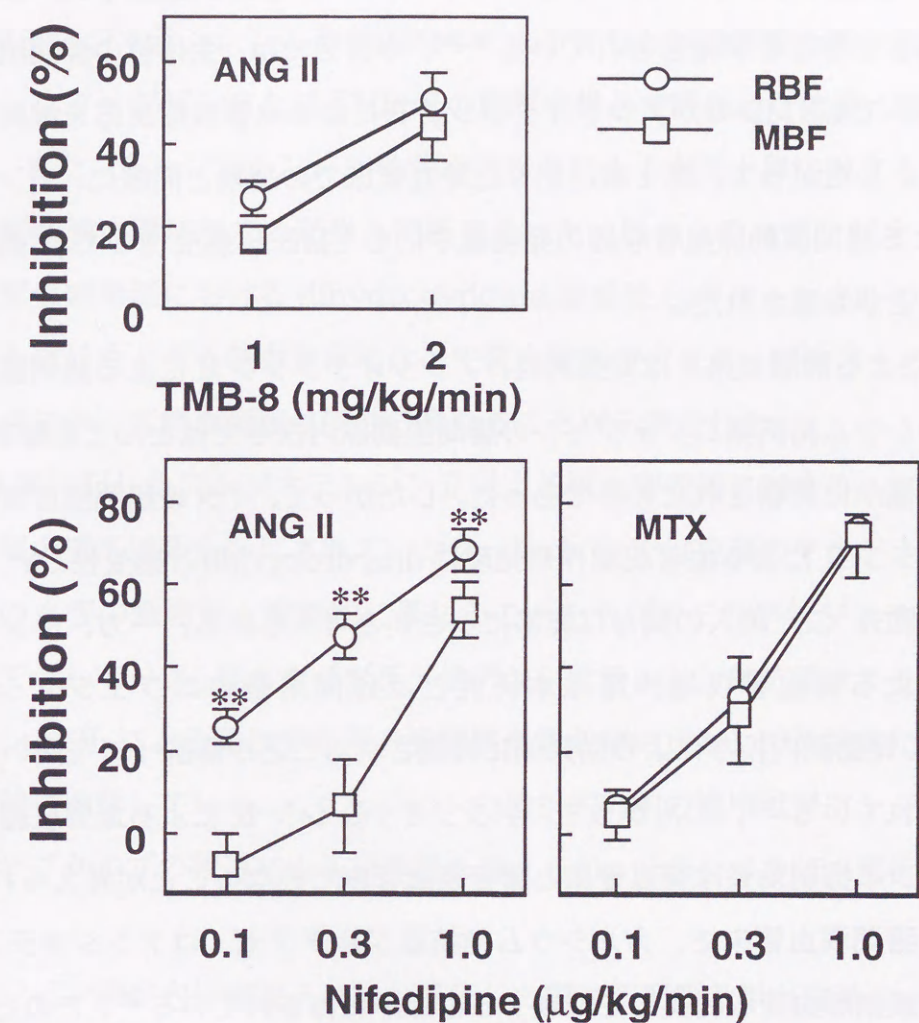


Fig. 7. The percent inhibition of angiotensin II-induced blood flow responses by TMB-8 (n=6, upper panel) and by nifedipine (n=6, lower left panel), and of methoxamine-induced blood flow responses by nifedipine (n=4, lower right panel). ANG II: Angiotensin II (100 ng/kg, i.v.); MTX: methoxamine (50 μg/kg, i.v.). Values are expressed as means \pm SE. **P<0.01 compared to the MBF response.

第3節 考 察

TMB-8は平滑筋細胞の筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離を抑制し⁷⁾、血管組織においても細胞内 Ca^{2+} 遊離抑制作用により、アンジオテンシンIIによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇反応を減弱させることが報告されている^{37,49)}。本研究では、生体位の腸間膜血管床のレベルにおいてもTMB-8がアンジオテンシンIIによる血管収縮反応を減弱させることを示した。したがって、第1章に記した腎血管床での結果と同様に、アンジオテンシンIIによる腸間膜動脈血管収縮の発現機序にもTMB-8感受性の Ca^{2+} 動態が関与していることが示唆された。

TMB-8による抑制効果とは対照的に、アンジオテンシンIIによる腸間膜動脈血管収縮はカルシウム拮抗薬ニフェジピンの腸間膜動脈内投与でほとんど影響を受けず、最高用量で僅かに抑制されたのみであった。したがって、イヌの腸間膜血管床ではアンジオテンシンIIによる血管収縮作用発現にdihydropyridine感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} 流入の関与は非常に小さいと考えられる。一方、アンジオテンシンIIによる腎血管収縮作用は本研究とほぼ同用量のニフェジピン(0.3-3 $\mu\text{g}/\text{min}$)の腎動脈内投与により効果的に抑制されることが麻酔イヌを用いた研究により報告されている²⁵⁾。したがって、アンジオテンシンIIによる血管収縮に対するニフェジピンの抑制効果は腎血管床と腸管膜血管床で異なることが考えられる。ところがネコの腸間膜血管床で、カルシウム拮抗薬ジルチアゼムはアンジオテンシンIIによる腸間膜動脈血管収縮反応を抑制することが報告されている²⁶⁾。このため、腎血管床と腸管膜血管床におけるアンジオテンシンIIによる血管収縮に対するニフェジピンの抑制効果を直接的に比較するためには、ニフェジピンが同一条件で各血管床に分布するように投与する必要があるが生じた。

この問題を解決するため、本章第2節に記したようにニフェジピンまたはTMB-8を静脈内持続投与し、これら薬剤のアンジオテンシンIIによる血管収縮に対する抑制効果を同一個体内の腎および腸間膜血管床で比較した。その結果、ニフェジピンはアンジオテンシンIIによる腸間膜動脈減少反応に影響を与えない用量で腎血流量減少反応を抑制し、血管床によりニフェジピンの抑制効果の異なることが観察された。一

方、アドレナリン α_1 受容体作動薬であるメソキサミン投与による腎および腸間膜動脈血流量減少反応はニフェジピンにより同程度抑制されたため、この腎血管選択的抑制はニフェジピンの両血管床への分布の違いによるものではないと思われる。一方、TMB-8はアンジオテンシンII静脈内投与による腎および腸間膜動脈血流量減少反応を抑制し、ニフェジピンまたはTMB-8の動脈内投与で評価した結果(第1節)が再現された。また、アンジオテンシンII静脈内投与による血圧上昇に対する各薬物の抑制効果は腸間膜血管に対する結果と同様であった。以上より、アンジオテンシンIIによる血管収縮発現におけるdihydropyridine感受性 Ca^{2+} チャンネルの寄与は腸間膜血管床をはじめとする他血管床に比べて腎血管床で大きく、細胞内への Ca^{2+} 動員という視点において腎血管床は特性の異なることが示唆された。

現在、本章に記したアンジオテンシンIIによる腎血管収縮に対するニフェジピンの選択的抑制の機序は明らかにされていない。Taubら⁴⁵⁾は腎臓のアンジオテンシン受容体が他の血管の受容体と機能的に異なることをペプチド性アンジオテンシン拮抗薬を用いて示している。我々もペプチド性アンジオテンシン拮抗薬サララシンがアンジオテンシンIIによる腎血管収縮を腸間膜血管収縮に比較して選択的に抑制することを予備的に確認している。ニフェジピンの選択的抑制の機序は腎アンジオテンシンII受容体サブタイプの相違による可能性も考えられ、分子レベルでの解析に興味を持たれる。

ニフェジピン静脈内持続注入により降圧した際に腸間膜動脈血流量は一定であり、腎動脈血流量は減少した。すなわち、ニフェジピンは腎血管に比べて腸間膜血管をより強く拡張させた。一方、ニフェジピンはアンジオテンシンIIによる腎血管収縮を選択的に抑制した。この結果は血管緊張性とアゴニストによる血管収縮に与えるニフェジピンの効果に乖離のあることを示している。しかし、血圧低下時には反射性に交感神経緊張が高まることで血管緊張性が変化するが、その程度が腎と腸間膜血管で異なることも考えられる。

以上より、腸管膜血管床ではアンジオテンシンIIによる血管収縮をTMB-8は抑制したがニフェジピンはほとんど影響を与えないことから、細胞内への Ca^{2+} 動員という視点において腎腸間膜血管床は腎血管床と特性が異なることが明らかになった。

第3章 アンジオテンシンIIによる抗利尿作用

発現における細胞内へのCa²⁺動員

アンジオテンシンIIは腎臓におけるナトリウム調節に重要な因子である。アンジオテンシンIIの投与は尿量と尿中Na⁺排泄を減少させ^{28,36)}、内因性アンジオテンシンIIの尿生成への寄与もアンジオテンシンII受容体拮抗薬ロサルタンの利尿作用²⁹⁾により明らかにされている。アンジオテンシンIIなどにより誘発される腎血管収縮は抗ナトリウム利尿作用の主要な因子に成りうるが、アンジオテンシンIIは直接近位尿細管に作用し、Na⁺/K⁺-ATPaseを活性化させることにより尿細管でのNa⁺再吸収を促進させることが報告されている^{2,51)}。

カルシウム拮抗薬CD-349と細胞内カルシウム遊離阻害薬TMB-8はアンジオテンシンIIによる腎血管収縮反応を抑制することを第1章に記した。ニカルジピン、ニフェジピン、ベラパミルなどカルシウム拮抗薬の腎動脈内投与はナトリウム利尿作用を引き起こすことがイヌを用いた検討により報告されている^{1,4,24)}。しかし、細胞内カルシウム遊離阻害薬が尿生成機構に与える影響は今までに報告されていない。そこでアンジオテンシンIIによる抗利尿発現におけるCa²⁺動員を検討するため、まずTMB-8の尿生成に与える影響を検討し、次にアンジオテンシンIIによる抗ナトリウム利尿作用に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンとTMB-8の影響を麻酔下イヌで検討した。

<実験方法>

尿生成測定系の作成

ペントバルビタール麻酔下イヌの左右側腹部を切開して左右腎動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で腎血流量を測定した。左腎動脈の起始部に薬液の腎動脈内投与用のポリエチレンチューブに接続した注射針(25G)を装着した。左右尿管に採尿用カニューレを挿入した。全身血圧を前腕動脈に挿入したカニューレを圧トランスデューサーに接続して測定した。糸球体濾過量を計測するため、イヌリンを初

回投与量50 mg/kgと維持量1 mg/kg/minで静脈内投与した。尿量が安定した時点で実験を開始した。尿と血中電解質、浸透圧およびイヌリン濃度は、炎光光度計、凝固点降下法およびアンスロン発色法でそれぞれ計測した。糸球体濾過量(GFR)、尿中Na⁺排泄率(FE_{Na})、浸透圧クリアランス(Cosm)および自由水再吸収量(T⁺H₂O)は以下の式により算出した。

$$\text{GFR (ml/min)} = \frac{\text{尿量 (ml/min)} \times \text{尿中イヌリン濃度 (mg/ml)}}{\text{血漿中イヌリン濃度 (mg/ml)}}$$

$$\text{FE}_{\text{Na}} (\%) = \frac{\text{尿中Na}^+\text{排泄速度} (\mu\text{Eq/min}) \times 100}{\text{血漿中Na}^+\text{濃度} (\mu\text{Eq/ml}) \times \text{GFR (ml/min)}}$$

$$\text{Cosm (ml/min)} = \frac{\text{尿量 (ml/min)} \times \text{尿浸透圧 (mOsm/kg)}}{\text{血漿浸透圧 (mOsm/kg)}}$$

$$\text{T}^+\text{H}_2\text{O (ml/min)} = \text{尿量 (ml/min)} \times \frac{\text{尿浸透圧 (mOsm/kg)} - \text{血漿浸透圧 (mOsm/kg)}}{\text{血漿浸透圧 (mOsm/kg)}}$$

第1節 細胞内カルシウム遊離阻害薬TMB-8の尿生成に与える影響

<方法>

初期値となる10分間採尿と動脈採血を行った後に、TMB-8を0.03 mg/kg/minで左腎動脈内に持続注入した。投与開始5分後より採尿を始め、10分間採尿と動脈採血を行い、さらにTMB-8の用量を0.1 mg/kg/minに増量して10分間採尿と動脈採血を行った。薬物を投与しない対側腎の採尿も同じスケジュールで行った。

<結果>

TMB-8の腎動脈内投与(0.03および0.1 mg/kg/min)は尿量(UV)を94±20 μl/minから157±28および359±111 μl/minへ増加させた。TMB-8は尿中Na⁺排泄量(U_{Na}V)を増加させ、腎血流量と糸球体濾過量(GFR)に影響を与えなかったため尿中Na⁺排泄率(FE_{Na})も増加させた(Fig. 8)。尿浸透圧(Uosm)はTMB-8により1528±203 mOsm/kgから1149±110および749±115 mOsm/kgへ低下

した。浸透圧クリアランス (COsm) は TMB-8 により増加したが、自由水再吸収量 (T^cH_2O) には影響を与えなかった。TMB-8 投与により全身血圧と心拍数は変化しなかった。対側腎の尿パラメータは変化しなかった (Fig. 8)。

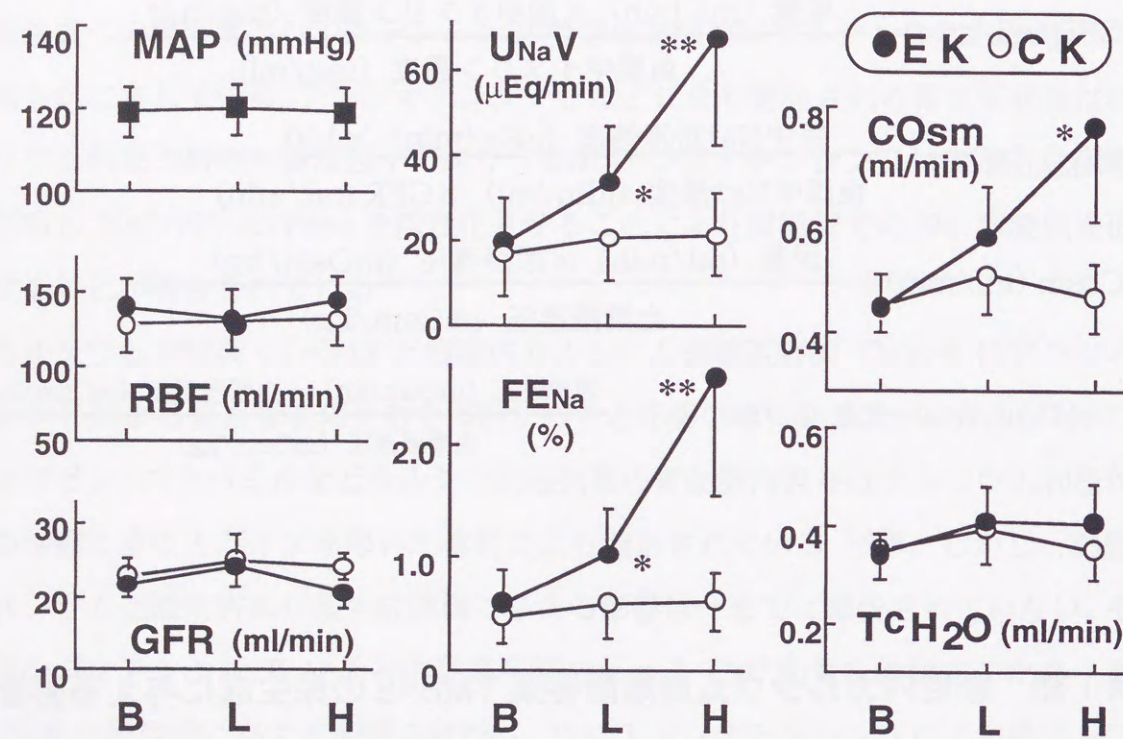


Fig. 8. Effects of TMB-8 on urine formation. Values are mean \pm SE. n=5. (●) Experimental (TMB-8-infused) kidney; (○) control (contralateral non-infused) kidney; MAP, mean arterial pressure; RBF, renal blood flow; GFR, glomerular filtration rate; $U_{Na}V$, urinary sodium excretion rate; FE_{Na} , fractional excretion of sodium; $COsm$, osmotic clearance; T^cH_2O , free water reabsorption. TMB-8 was infused into the renal artery at increasing doses of 0.03 (L) and 0.1 (H) mg/kg per min. * P <0.05, ** P <0.01 compared with the basal (B) value.

第2節 アンジオテンシンIIの抗利尿作用に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離阻害薬

TMB-8の作用

<方法>

初期値となる10分間採尿と動脈採血を行った後、ニフェジピン (0.1 μ g/kg/min) または TMB-8 (75 μ g/kg/min) を腎動脈内に持続注入を開始し、10分間採尿と動脈採血を行い、ナトリウム利尿反応を得た。尿量が回復した後にアンジオテンシンII (10 ng/kg/min) を静脈内持続投与し、投与開始20分後より10分間採尿と動脈採血を行った。再び同用量のニフェジピンまたは TMB-8 を腎動脈内投与して10分間採尿と動脈採血を行い、ナトリウム利尿反応を観察した。

<結果>

ニフェジピンまたは TMB-8 の腎動脈内投与により腎血流量と糸球体濾過量に変化することなく UV 、 $U_{Na}V$ および FE_{Na} が増加した。ニフェジピンまたは TMB-8 の投与中止30分後にこれらの値は初期値に回復した。アンジオテンシンII持続投与により全身血圧の上昇と腎血流量の低下が観察され、投与開始10分以降、これらのパラメータは安定していた (Table 8)。アンジオテンシンIIにより UV 、 $U_{Na}V$ および FE_{Na} が減少したが、統計学的に有意なものではなかった。アンジオテンシンII存在下でニフェジピンと TMB-8 は UV 、 $U_{Na}V$ および FE_{Na} を増加させ、その増加の程度はアンジオテンシンII非存在下に比べ有意に大きなものであった (Figs. 9, 10)。ニフェジピンはアンジオテンシンII非存在下で腎血流量を変化させなかったが、アンジオテンシンII存在下で腎血流量を増加させた (Table 8)。

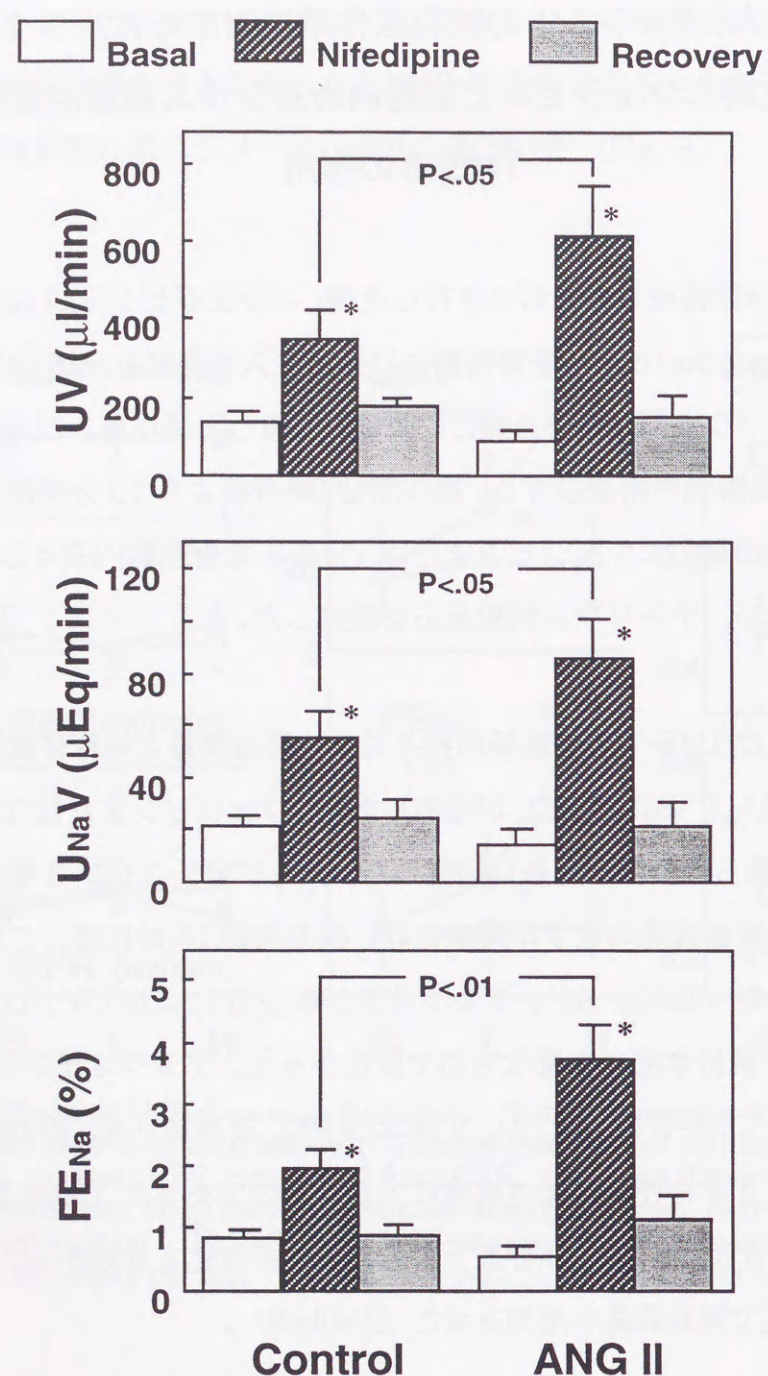


Fig. 9. Effects of nifedipine on urinary sodium excretion in the absence or presence of angiotensin II. ANG II: Angiotensin II; UV: urine flow rate; U_{Na}V and FE_{Na}: absolute and fractional excretion of sodium, respectively. Nifedipine (0.1 μg/kg/min) was infused into the renal artery before and during i.v. infusion of angiotensin II (10 ng/kg/min). Values represent means ± SE. (n=5). *P<0.05 compared to the basal values in each experimental period.

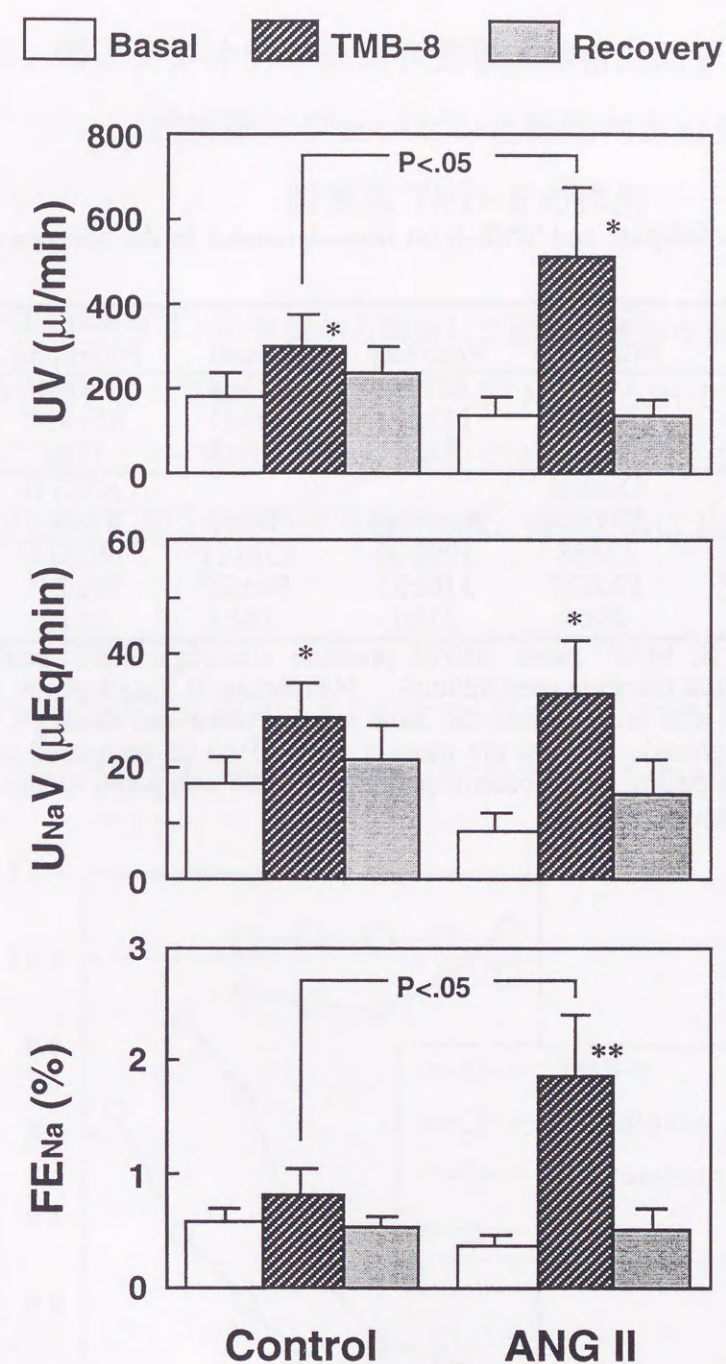


Fig. 10. Effects of TMB-8 on urinary sodium excretion in the absence or presence of angiotensin II. ANG II: Angiotensin II; UV: urine flow rate; U_{Na}V and FE_{Na}: absolute and fractional excretion of sodium, respectively. TMB-8 (75 μg/kg/min) was infused into the renal artery before and during i.v. infusion of angiotensin II (10 ng/kg/min). Values represent means ± SE. (n=5). *P<0.05, **P<0.01 compared to the basal values in each experimental period.

Table 8. Effects of nifedipine and TMB-8 on hemodynamics in the absence or presence of angiotensin II

| | Basal | Control Nifedipine | Recovery | Basal | ANG II Nifedipine | Recovery |
|-----|--------|-----------------------|----------|---------------------|----------------------|---------------------|
| MAP | 120±4 | 119±4 | 121±4 | 133±4 ^s | 130±4 ^s | 130±6 ^s |
| RBF | 119±5 | 121±6 | 110±12 | 70±11 ^s | 85±11 ^{sa} | 63±11 ^s |
| GFR | 19±3 | 21±5 | 20±4 | 15±3 | 15±2 | 11±2 ^s |
| | Basal | Control TMB-8 | Recovery | Basal | ANG II TMB-8 | Recovery |
| MAP | 125±8 | 124±8 | 129±10 | 139±11 ^s | 140±11 ^s | 138±12 ^s |
| RBF | 120±27 | 120±27 | 116±31 | 94±23 ^s | 99±21 ^s | 95±19 ^s |
| GFR | 19±3 | 24±4 | 25±4 | 18±3 | 21±3 | 19±2 |

ANG II: Angiotensin II; MAP: mean arterial pressure (mmHg); RBF: renal blood flow (ml/min); GFR: glomerular filtration rate (ml/min). Nifedipine (0.1 µg/kg/min, n=5) or TMB-8 (75 µg/kg/min, n=5) was infused into the renal artery before and during i.v. infusion of angiotensin II (10 ng/kg/min). Values are mean ± SE. ^aP<0.05 compared to the values at corresponding sampling points in the control period. ^sP<0.05 compared to the basal value in the angiotensin II infusion period.

第3節 腎アンジオテンシンII受容体結合に対するカルシウム

拮抗薬ニフェジピンと細胞内カルシウム遊離

阻害薬 TMB-8 の作用

<方法>

Sprague-Dawley ラットの腎臓から調製した細胞膜標本を用い、^[125I]アンジオテンシンII 結合に対するニフェジピン (10^{-9} ~ 10^{-5} M)、TMB-8 (10^{-9} ~ 10^{-5} M)、アンジオテンシンII (10^{-11} ~ 10^{-5} M) およびアンジオテンシンII 受容体拮抗薬ロサルタン (10^{-10} ~ 10^{-5} M) の結合阻害作用を検討した。実験方法は Edwards ら¹⁴⁾ の報告に準じた。

<結果>

^[125I]アンジオテンシンII 結合はアンジオテンシンII とロサルタンにより阻害されたが、ニフェジピンや TMB-8 では 10^{-9} ~ 10^{-5} M で影響を受けなかった。

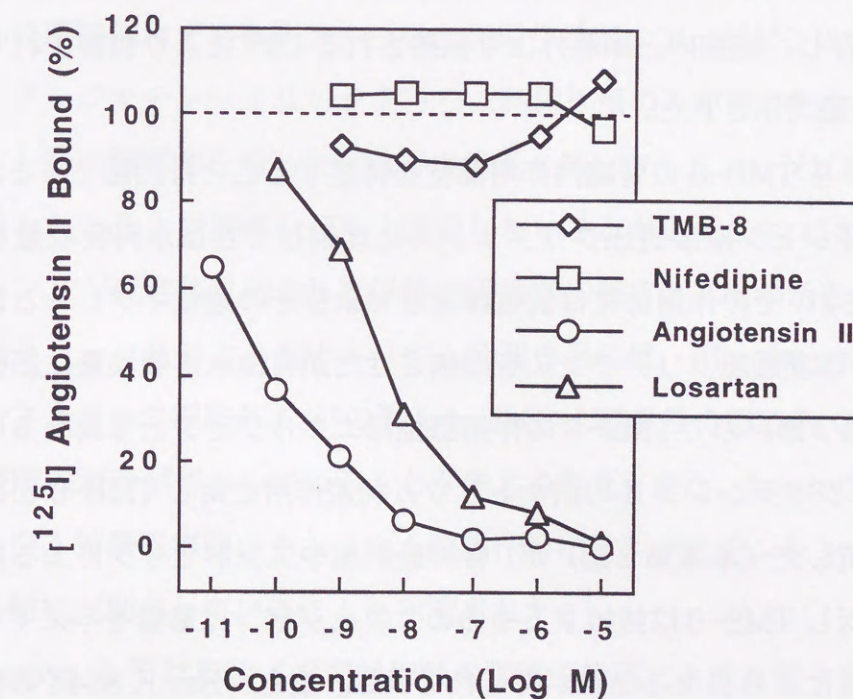


Fig. 11. Effects of nifedipine, TMB-8, losartan and angiotensin II on the binding of ^[125I]angiotensin II in the kidney of Sprague-Dawley rats. Values represent means of 2 experiments.

第4節 考 察

TMB-8 を腎動脈内に投与すると尿中 Na^+ 排泄が促進することから、TMB-8 にはナトリウム利尿作用のあることが示された（本章第1節）。カルシウム拮抗薬ニフェジピンは尿細管へ直接作用してナトリウム利尿作用を引き起こすことが報告されている²⁴⁾が、細胞内カルシウム遊離阻害薬もナトリウム利尿作用を誘発することが本研究で新たに示された。したがって、尿細管細胞の細胞内 Ca^{2+} 遊離が Na^+ 再吸収調節に重要な役割を担っていることが明らかになった。TMB-8 は腎血流量や糸球体濾過量に影響を与えないことから、腎血行動態変化を介する二次的な尿細管への作用ではなく、直接的に尿細管へ作用して Na^+ 再吸収を抑制し、ナトリウム利尿作用を誘発させたと考えられる。本研究で利尿作用を示す TMB-8 の投与量（0.03-0.1 mg/kg/min）はアンジオテンシン II やバソプレシンの腎血管収縮反応を抑制したときと同用量である（第1章）。したがって、TMB-8 は細胞内 Ca^{2+} 遊離抑制作用によりナトリウム利尿作用を発現したと考えられる。以上より、尿細管 Na^+ 輸送機構は細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存し、細胞内と細胞外より供給される Ca^{2+} により制御されていることが *in vivo* の腎臓で示された。

本研究結果のみから TMB-8 の腎臓内作用部位を特定することは困難である。カルシウム拮抗薬ニカルジピンは浸透圧クリアランスに比例して自由水再吸収量を増加させることが報告され、その作用部位は近位尿細管およびその遠位ネフロンと言われている¹⁾。TMB-8 は浸透圧クリアランスを増加させたが自由水再吸収量に影響を与えなかった（本章第1節）ので TMB-8 の作用部位はニカルジピンとは異なる可能性が推測される。アンジオテンシン II の抗ナトリウム利尿作用に対し TMB-8 とニフェジピンはともに拮抗した（本章第2節）が、腎神経刺激やエンドセリンによる抗ナトリウム利尿作用に対し TMB-8 は拮抗するもののニフェジピンは影響を与えず^{32,43)}、抗利尿作用誘発物質により異なる結果が得られている。また、Bay K 8644 の腎血管収縮はカルシウム拮抗薬で抑制されるが TMB-8 で影響されなかった（第1章）。このため、TMB-8 の腎臓内の作用部位はカルシウム拮抗薬と異なることが想定される。しかし、TMB-8 のナトリウム利尿作用の正確な作用部位を考察するには尿細管のス

トップフロー法などを用いた詳細な検討が必要である。

本章第2節にはカルシウム拮抗薬または細胞内カルシウム遊離阻害薬のナトリウム利尿作用はアンジオテンシン II 存在下で増大することを示した。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬がナトリウム利尿作用を示すことから、腎臓における Na^+ 排泄機構に内因性のアンジオテンシン II は重要な役割を担っていることが知られている²⁹⁾。比較的低用量のアンジオテンシン II は尿細管に直接作用して抗ナトリウム利尿作用をもたらすが、アンジオテンシン II の用量が増すと血圧上昇による糸球体濾過量や尿細管周囲血管の静水圧上昇が関与してナトリウム利尿作用に転じ、アンジオテンシン II の尿生成機構に与える作用はその血中濃度により二相性であることが報告されている¹⁷⁾。本章で用いた 10 ng/kg/min の投与量のアンジオテンシン II では昇圧作用が観察されたものの、抗ナトリウム利尿作用が誘発された。この状態でニフェジピンと TMB-8 のナトリウム利尿反応を観察したところ、コントロール時に比べニフェジピンと TMB-8 のナトリウム利尿作用が増大した。この増大はアンジオテンシン II の尿細管への直接作用である抗ナトリウム利尿作用がニフェジピンと TMB-8 により拮抗され、アンジオテンシン II のナトリウム利尿作用のみが現れたためと考えられた。

ラット腎の膜標本を用いた研究（本章第3節）で、ニフェジピンと TMB-8 はアンジオテンシン II と受容体レベルで拮抗しないことが確認され、これら薬剤はアンジオテンシン II が受容体に結合した以降の過程を抑制することが示された。以上より、アンジオテンシン II による抗ナトリウム利尿作用には、dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者が寄与していることが考えられた。また、カルシウム拮抗薬と細胞内カルシウム遊離阻害薬のナトリウム利尿作用にアンジオテンシン II の尿細管作用に対する拮抗が関与していることも示唆された。

Imagawa ら²⁵⁾は麻酔イヌで対側腎の灌流圧低下により血漿中アンジオテンシン II 濃度を上昇させた際に、カルシウム拮抗薬ニフェジピンの腎血管拡張作用が増強されることを報告している。本章第2節で示したように腎血流量を変化させない用量のニフェジピンは、アンジオテンシン II 投与下で腎血流量を増加させ、Imagawa ら²⁵⁾の報告と同様の結果が得られた。このとき糸球体濾過量は変化しなかったのでニフェ

ジピンは輸入細動脈に比べ輸出細動脈を拡張させたと推測される。一方、TMB-8 はアンジオテンシン存在下で尿細管では作用を発揮したが、腎血流量と糸球体濾過量に影響を与えなかった。以上の結果はアンジオテンシン II 静脈内持続投与時に腎血管では TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 遊離機構が作動していない可能性を示している。しかしながら、本研究で用いた TMB-8 の用量はアンジオテンシン II による腎血管収縮を抑制した（第 1 章）。一方でアンジオテンシン II は腎プロスタグランジン産生を促進し、TMB-8 がそのプロスタグランジン産生を抑制することが報告されている⁹⁾。アンジオテンシン II 存在下のニフェジピンと TMB-8 の腎血管拡張作用の違いに腎プロスタグランジンが関与している可能性が考えられ、この点を明確にするためには更なる検討が必要である。

以上より、アンジオテンシン II による抗ナトリウム利尿作用には dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネルからの細胞外 Ca^{2+} の流入と TMB-8 感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者が寄与していることが示された。

第 4 章 N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用を併せ持つ カルシウム拮抗薬シルニジピンの腎作用

近年、電気生理学や分子生物学の発達により Ca^{2+} チャンネルに多様性のあることが判明し、多くのサブタイプの存在が確認されている。現在では L 型、T 型、N 型、P 型、Q 型および R 型の少なくとも 6 つにサブタイプが分類され、ニフェジピンを代表とする dihydropyridine 系カルシウム拮抗薬は血管平滑筋に存在する L 型 Ca^{2+} チャンネルに対し強い親和性を持ち、細胞内への Ca^{2+} 流入を阻害して血管拡張作用を示す。このためカルシウム拮抗薬は高血圧や狭心症などの循環器疾患の治療に用いられているが、血圧低下に伴う反射性の交感神経活性上昇により頻脈を引き起こすことが、臨床上問題となっている。近年、臨床に導入された L 型と N 型の両タイプの Ca^{2+} チャンネルを抑制するシルニジピン¹⁶⁾は反射性頻脈を起こしにくいことが報告されている²¹⁾。交感神経からの神経伝達物質放出には細胞内への Ca^{2+} 流入が必須であるが、この流入経路に N 型 Ca^{2+} チャンネルが大きく寄与していることが知られている²⁰⁾。このためシルニジピンは N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用により反射性頻脈を起こしにくいと考えられている。しかし、シルニジピンの N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用は脊椎後根細胞（知覚神経細胞）で検討されたもので、交感神経細胞の N 型 Ca^{2+} チャンネルに対する作用は明らかにされていない。

腎臓は交感神経に支配されている臓器であり、その機能は交感神経活性に大きく左右される。腎交感神経の活性化は腎血流量の低下、抗利尿作用に基づく体液貯留、さらにレニン分泌を引き起こし、全身血圧調節を修飾する。腎神経を電気的に刺激することで誘発される腎血管収縮や抗ナトリウム利尿作用はカルシウム拮抗薬で影響を受けない^{26,32)}ことから、カルシウム拮抗薬を投与することで観察される腎血流量増加やナトリウム利尿作用は交感神経系とは無関係の作用と考えられている。L 型と N 型 Ca^{2+} チャンネルを同時に抑制するシルニジピンも腎血流量を増加させ、ナトリウム利尿させることが自然発症高血圧ラットで示されている¹³⁾。これらの腎作用についてシルニジピンの腎交感神経抑制の関与は明らかにされていない。

本章では、シルニジピンの腎交感神経に対する作用を明らかにするため、単離交感神経細胞の N 型 Ca^{2+} 電流および腎神経刺激時の腎血管および尿生成の変化に与えるシルニジピンの作用を検討した。

第 1 節 交感神経節細胞におけるシルニジピンの N 型 Ca^{2+} チャンネルに対する作用

<方法>

ペントバルビタールで麻酔した Wistar ラット (2~4 週令) の上頸神経節を切除し、 Ca^{2+} -free Tyrode 液に溶解したパパインで 20 分間、37℃で酵素処理した。次にコラゲナーゼ Type II とディスパーゼの混合液で 1 時間、37℃で酵素処理した。酵素処理後、ピペッティング操作で機械的に神経節細胞を単離し、10 時間以内に実験に用いた。細胞膜電流を Whole-Cell Patch-Clamp 法により計測した^{18,48)}。細胞外液と電極内液の組成は以下の通りとした。

細胞外液 (mM): 130 NaCl, 4 CsCl, 1 MgCl_2 , 10 BaCl_2 , 10 HEPES, 10 glucose and 0.001 tetrodotoxin

電極内液 (mM): 75 CsCl, 75 Cs-methanesulfonate, 2 ATP-Mg and 10 HEPES. pH は Tris-OH で 7.2 に調整した。

Ca^{2+} チャンネルを介する電流測定にはチャージキャリアーとして Ba^{2+} を用いた。薬物の標本への適用は薬物の急速交換可能な Y チューブ法³¹⁾ を用いた。

Ba^{2+} 電流の電位依存性

保持電位 -60 mV より様々な電位まで 100 msec 矩形波の脱分極パルスを与え、そのときに生じる Ba^{2+} 電流を計測した。

Ba 電流に対するペプチドカルシウム拮抗薬の作用

保持電位 -60 mV より ± 0 mV まで 50 msec 矩形波の脱分極パルスで与え、そのときに生じる Ba^{2+} 電流を計測した。細胞外液に ω -conotoxin-GVIA (ω -Cg-GVIA, 1 μM)、 ω -agatoxin-IVA (ω -Aga-IVA, 0.1 μM)、 ω -conotoxin-MVIIIC (ω -Cg-MVIIIC, 3 μM) および Calciseptine (3 μM) を累積的に添加し、それぞれの添加 2 分後より Ba^{2+} 電流を計測した。

Ba^{2+} 電流に対するシルニジピンの作用

保持電位 -60 mV より ± 0 mV まで 50 msec 矩形波の脱分極パルスで与え、そのときに生じる Ba^{2+} 電流を計測した。細胞外液にシルニジピンを 10^{-9} M から 10^{-5} M まで累積的に添加し、それぞれの添加 2 分後より Ba^{2+} 電流を計測した。

Ba^{2+} 電流に対するニフェジピン、ベラパミル、ジルチアゼムおよびフルナリジンの作用

保持電位 -60 mV より ± 0 mV まで 50 msec 矩形波の脱分極パルスで与え、そのときに生じる Ba^{2+} 電流を計測した。細胞外液にニフェジピン、ベラパミルまたはジルチアゼムを 3×10^{-6} M から 10^{-4} M まで、フルナリジンは 10^{-7} M から 3×10^{-5} M まで累積的に添加し、それぞれの添加 2 分後より Ba^{2+} 電流を計測した。

<結果>

本研究で用いたラット上頸神経節細胞の Ca^{2+} 電流は膜電位依存的であり、N 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬 ω -Cg-GVIA で $85 \pm 4\%$ 抑制され、P 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬 ω -Aga-IVA で $0 \pm 2\%$ 、Q 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬 ω -Cg-MVIIIC で $3 \pm 2\%$ 、L 型 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬 Calciseptine では $3 \pm 2\%$ しか抑制されなかった。これらペプチド拮抗薬で抑制されない成分は $9 \pm 3\%$ であった (Fig. 12)。シルニジピンはこの Ca^{2+} 電流を濃度依存的に抑制し、その Kd 値は 0.83 μM であった (Fig. 13)。ニフェジピン、ジルチアゼムおよびベラパミルはシルニジピンに比較して高濃度で Ca^{2+} 電流を抑制し、その Kd 値はそれぞれ 127、94.7 および 43.0 μM であった。非選択的カルシウム拮抗薬フルナリジンも Ca^{2+} 電流を抑制し、その Kd 値は 2.75 μM であった (Fig. 14)。

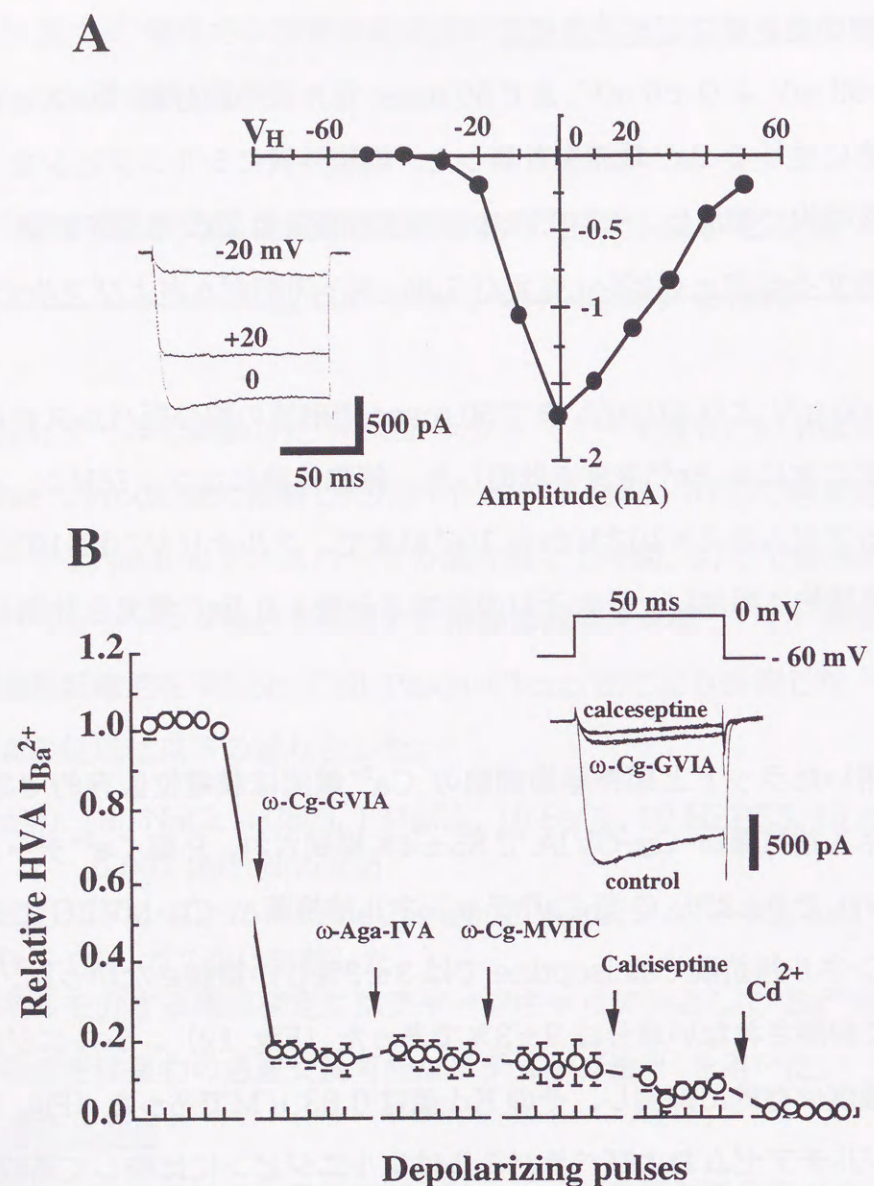


Fig. 12. The high voltage activated (HVA) Ca^{2+} channel current in rat superior cervical ganglia neurones. (A) The current-voltage relationship for HVA I_{Ba} . HVA I_{Ba} was elicited by a 100 ms depolarizing pulse from -60 mV to various potentials every 15 s. The amplitude of I_{Ba} was measured at the peak. The figure is typical of three reproducible observations. (B) The effects of specific peptide inhibitors for various types of HVA Ca^{2+} channels. The neurone was held at a V_H of -60 mV and HVA I_{Ba} was elicited by 50 ms depolarizing pulses to 0 mV. Each drug was applied to the neurone 2 min before the subsequent five depolarizing pulses were applied every 15 s.

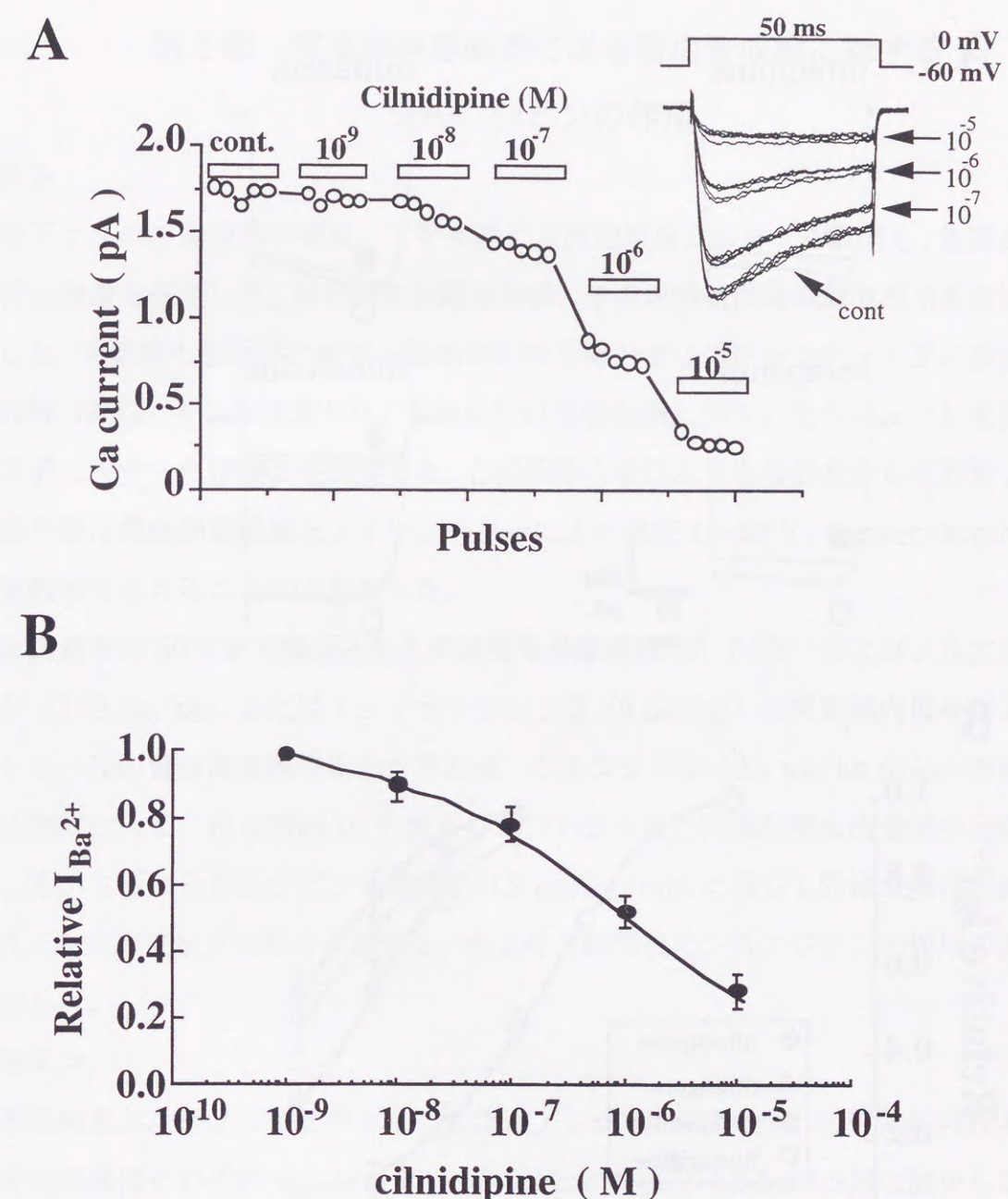


Fig. 13. The effects of cilnidipine on HVA I_{Ba} . (A) The concentration- and time-dependent effects of cilnidipine. Neurone was held at a V_H of -60 mV and HVA I_{Ba} was elicited by 50 ms depolarizing pulses to 0 mV. Each concentration of cilnidipine was applied to the neurone 2 min before subsequent five depolarizing pulses were applied every 15 s. The amplitude of I_{Ba} was measured at the peak. All recordings were obtained from the same neurone. (B) Concentration-inhibition curve of cilnidipine for HVA I_{Ba} . Inhibitory effects of cilnidipine were evaluated when the maximum inhibition was attained by 5th pulses. All responses were normalized to the peak current amplitude in the absence of cilnidipine. Each point and vertical lines represents the mean \pm SE., respectively, from 6 experiments.

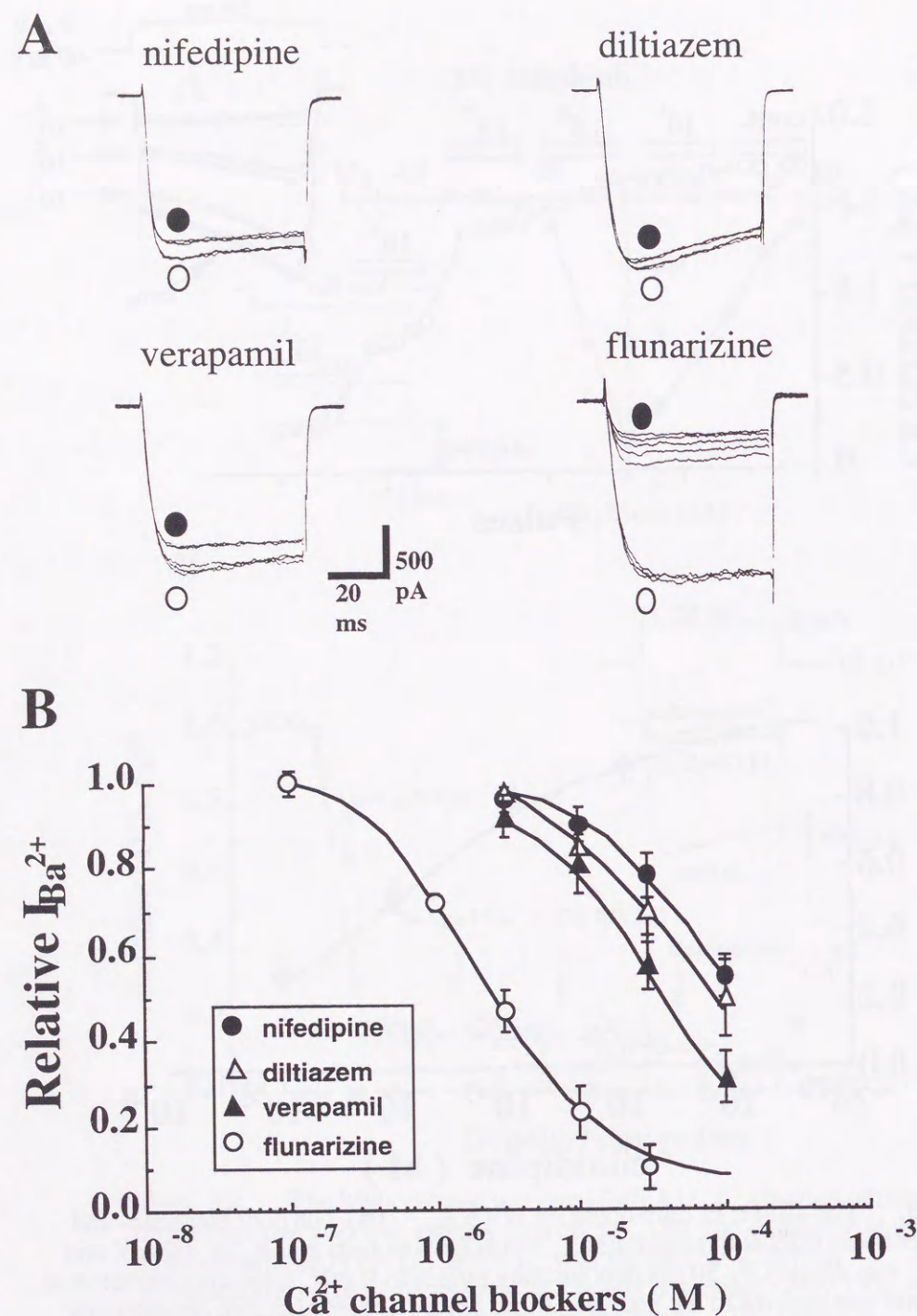


Fig. 14. The effects of organic Ca²⁺ blockers on HVA I_{Ba}. (A) A typical current trace of HVA I_{Ba} in the presence (●) and absence (○) of blockers. HVA I_{Ba} was elicited by 50 ms depolarizing pulses from a V_H of -60 mV to 0 mV. Each blocker was pretreated for 2 min before five depolarizing pulses were subsequently applied every 15 s. (B) Concentration-inhibition curve of nifedipine, diltiazem, verapamil and flunarizine for HVA I_{Ba}. The inhibitory effects of the blockers were evaluated when the maximum inhibition was attained by the 5th pulses. All responses were normalized to the peak current amplitude in the absence of each blocker. Each point and vertical lines represents the mean ± SE., respectively, from 4 different experiments.

第2節 腎交感神経刺激による腎血管収縮に対する シルニジピンの作用

<方法>

麻酔下イヌの左側腹部を切開して腎動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で腎血流量を測定した。腎神経を剥離結紮後、その末梢側に電気刺激用双極電極を装着した。腎動脈の起始部に薬液の腎動脈内投与用のポリエチレンチューブに接続した注射針(25G)を2本装着した。全身血圧は前腕動脈に挿入したカニューレを圧トランスデューサーに接続して測定した。心拍数は心電図より心拍計を介して計測した。腎神経刺激は電気刺激装置とアイソレーターにより電圧 10-20 V、1 msec duration の電気刺激を与えることにより行った。

腎血流量を約 50% まで減少させる高頻度腎神経刺激 (3-7 Hz) およびノルエピネフリン (100 ng/kg) またはアンジオテンシン II (5 ng/kg) の腎動脈内投与によりコントロールの腎血流量減少反応を得た後、シルニジピン (0.1 μg/kg/min) を腎動脈内に持続注入し、投与開始 10 分後よりコントロールと同様な腎血流量減少反応を観察した。さらにシルニジピンの用量を 0.3 μg/kg/min に増して同様な操作を繰り返した。シルニジピンの投与を中止し、およそ 1 時間後にシルニジピンの作用の回復を観察した。

<結果>

腎神経刺激およびノルエピネフリンまたはアンジオテンシン II の腎動脈内投与により腎血流量はそれぞれ -55.3 ± 1.8、-55.5 ± 2.2 および -52.9 ± 2.9% に減少した。これらの反応はシルニジピンの用量に依存して有意に抑制され、アンジオテンシン II に対する抑制の程度が一番大きく、以下ノルエピネフリン、腎神経刺激の順であった。投与中止 1 時間後にはシルニジピンの抑制作用は減弱した (Fig. 15)。シルニジピンの腎動脈内投与により全身血圧が低下し、腎血流量が増加した (Table 9)。

Table 9. Effects of intrarenal arterial infusion of cilnidipine on renal and systemic hemodynamics in dogs

| | Control | Cilnidipine ($\mu\text{g/kg/min}$) | | Recovery |
|----------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 0.1 | 0.3 | |
| RBF (ml/min) | 83 \pm 8 | 91 \pm 10 | 97 \pm 13 ^b | 87 \pm 10 |
| MAP (mmHg) | 120 \pm 1 | 114 \pm 3 ^a | 106 \pm 1 ^b | 108 \pm 3 ^b |
| HR (beats/min) | 128 \pm 13 | 126 \pm 12 | 129 \pm 12 | 121 \pm 12 |

Data were obtained at 10 minutes after the start of cilnidipine infusion. Values are means \pm SE. (n=6). ^aP<0.05, ^bP<0.01 compared with values in the control period. RBF; renal blood flow, MAP; mean arterial pressure, HR; heart rate.

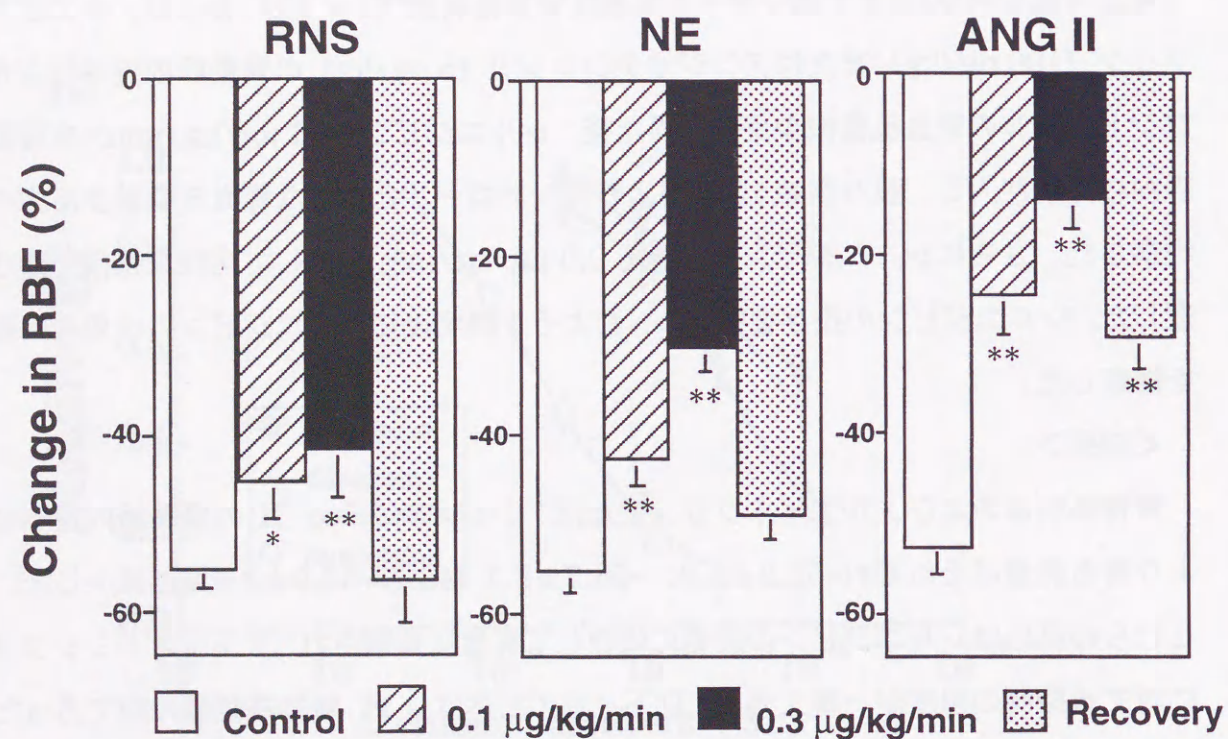


Fig. 15. Effects of intrarenal arterial infusion of cilnidipine (n=6) on renal nerve stimulation (RNS)-, norepinephrine (NE)- and angiotensin II (ANG II)-induced renal vasoconstriction in anesthetized dogs. Values are expressed as means \pm SE. *P<0.05, **P<0.01 compared with the corresponding control values.

第3節 腎交感神経刺激による抗利尿およびノルエピネフリン

放出に対するシルニジピンの作用

<方法>

麻酔下イヌの左側腹部を切開して腎動脈に血流測定用プローブを装着し、電磁血流計で腎血流量を測定した。腎神経を剥離結紮後、その末梢側に電気刺激用双極電極を装着した。腎神経刺激は電気刺激装置とアイソレーターにより電圧 10–20 V、1 msec duration の電気刺激を与えることにより行った。腎動脈の起始部に薬液の腎動脈内投与用のポリエチレンチューブに接続した注射針 (25G) を装着した。左腎静脈および左尿管にカニユーレを挿入し、それぞれ採血および採尿用に用いた。全身血圧は前腕動脈に挿入したカニユーレを圧トランスデューサーに接続して測定した。心拍数は心電図第2誘導より心拍計を駆動して計測した。糸球体濾過量を計測するため、クレアチンを初回投与量 50 mg/kg と維持量 1 mg/kg/min で静脈内投与した。尿量が安定した時点で実験を開始した。尿中および血漿中電解質濃度はイオン選択電極法、クレアチン濃度はヤッフ変法で測定した。血漿中ノルエピネフリン濃度は高速液体クロマトグラフィーで分離し、diphenyl ethylenediamine で発色させ定量した。

初期値となる 10 分間採尿と動脈および腎静脈採血を行った後、腎血流量にほとんど影響を与えない低頻度腎神経刺激 (0.5–1 Hz) を開始して再び 10 分間採尿と採血を行い、抗ナトリウム利尿反応を得た。尿量が回復した後、シルニジピン (0.3 $\mu\text{g/kg/min}$) の腎動脈内持続投与を開始した。尿量が安定した時点で 10 分間採尿と採血を行い、再び腎神経刺激して 10 分間採尿と採血を行った。シルニジピンの投与を中止し、およそ 1 時間後にシルニジピンの作用の回復を観察した。

<結果>

低頻度腎神経刺激は腎血流量を変化させることなく尿量 (UV)、尿中 Na^+ 排泄量 ($\text{U}_{\text{Na}}\text{V}$) および尿中 Na^2+ 排泄率 (FE_{Na}) をそれぞれ -65.5 ± 7.1 、 -70.8 ± 6.4 および $-53.1 \pm 6.4\%$ に減少させた。シルニジピンの腎動脈内持続投与により UV、 $\text{U}_{\text{Na}}\text{V}$ および FE_{Na} が有意に増加し、血圧が低下した (Table 10)。低頻度腎神経刺激によ

る FE_{Na} の減少反応はシルニジピンにより有意に抑制された (Fig. 16)。統計学的には有意でないものの、低頻度腎神経刺激による UV と $U_{Na}V$ の減少反応もシルニジピンにより減弱した。同時に低頻度腎神経刺激時の腎からのノルエピネフリン分泌速度増加反応もシルニジピンにより有意に抑制された (Fig. 16)。これらのシルニジピンによる抑制作用はシルニジピン投与中止 1 時間後にはすべて回復した。

Table 10. Effects of intrarenal arterial infusion of cilnidipine on urinary parameters, renal and systemic hemodynamics in dogs.

| | Control | Cilnidipine | Recovery |
|---------------------|-----------|-------------------------|--------------------|
| UV (ml/min) | 0.30±0.08 | 1.68±0.58 ^b | 0.42±0.16 |
| $U_{Na}V$ (μEq/min) | 58.2±22.7 | 224.3±76.4 ^b | 77.4±34.6 |
| FE_{Na} (%) | 1.8±0.6 | 7.1±1.7 ^b | 2.6±1.0 |
| RBF (ml/min) | 86±10 | 98±19 | 82±12 |
| C_{Cre} (ml/min) | 21.5±2.0 | 20.5±3.2 | 20.7±1.6 |
| MAP (mmHg) | 147±8 | 132±7 ^b | 130±9 ^b |
| HR (beats/min) | 119±11 | 126±9 | 119±11 |

Values are means ± SE. (n=5). Cilnidipine was infused into the renal artery at a dose of 0.3 μg/kg/min. ^bP<0.01 compared with values in the control period. UV; urinary volume, $U_{Na}V$; urinary sodium excretion, FE_{Na} ; fractional excretion of sodium, RBF; renal blood flow, C_{Cre} ; creatinine clearance, MAP; mean arterial pressure, HR; heart rate.

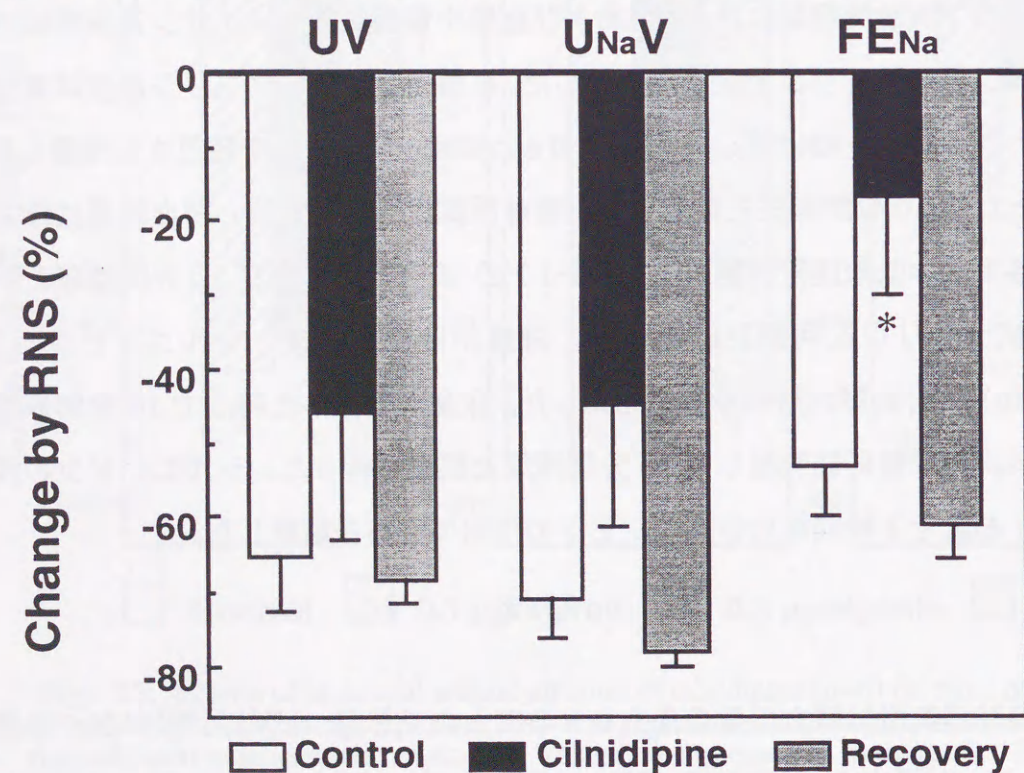


Fig. 16. Effects of intrarenal arterial infusion of cilnidipine on renal nerve stimulation (RNS)-induced decrease in urinary flow rate (UV), urinary sodium excretion ($U_{Na}V$) and fractional excretion of sodium (FE_{Na}) in anesthetized dogs (n=5). Values are expressed as means±SE. *P<0.05 compared with the corresponding control values.

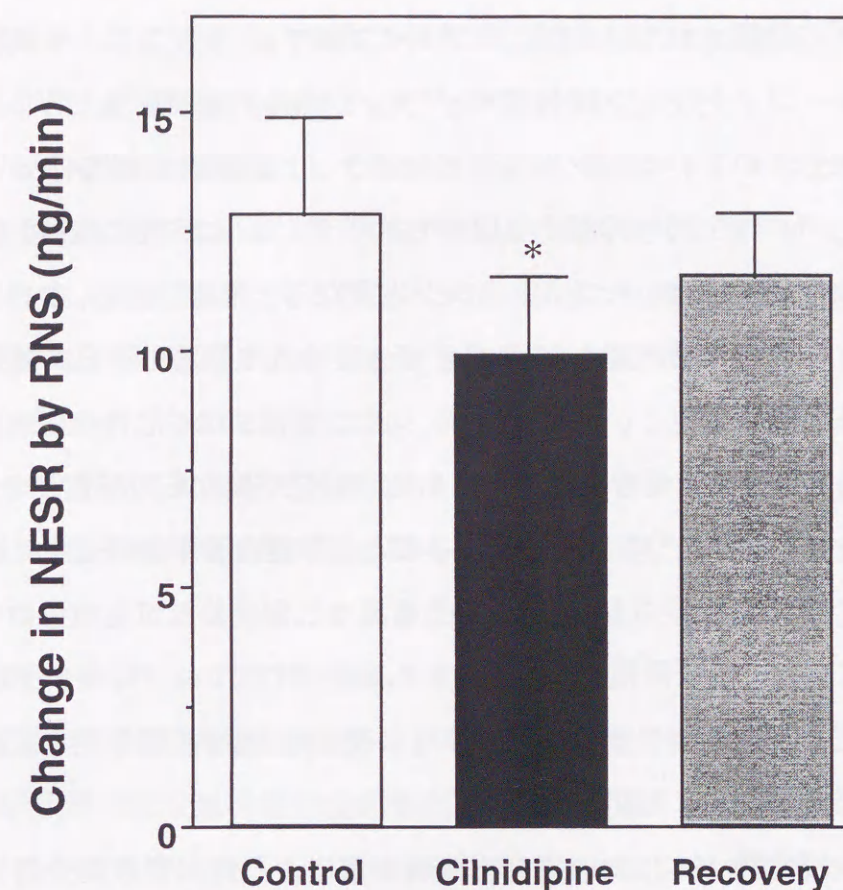


Fig. 17. Effects of intrarenal arterial infusion of cilnidipine on renal nerve stimulation (RNS)-induced increase in norepinephrine secretion rate (NESR) in anesthetized dogs (n=5). Values are expressed as means±SE. *P<0.05 compared with the control values.

第4節 考察

交感神経終末から神経伝達物質が放出される際に細胞内への Ca^{2+} 流入が必須であるが、このときにN型 Ca^{2+} チャンネルが重要な役割を担っていることが知られている²⁰⁾。本研究で用いたラット上頸神経節細胞は交感神経細胞であり、この細胞の Ca^{2+} 電流はω-Cg-GIVAで80%以上抑制されたことから、N型 Ca^{2+} 電流が主体であることが示された。この Ca^{2+} 電流に対するカルシウム拮抗薬の抑制効果を K_d 値で比較すると、シルニジピン>フルナリジン>ベラパミル>ジルチアゼム>ニフェジピンの順であり、シルニジピンはベラパミルより50倍以上強力であった。

N型 Ca^{2+} チャンネルは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルであり、5つのタンパクのサブ

ユニットから形成されている。電位依存性 Ca^{2+} チャンネルはN型以外にL、T、P、Qのサブタイプに分類されているが、サブタイプ間で α_1 サブユニット構造が異なるのみである。 ω -コノトキシンはN型 Ca^{2+} チャンネルの α サブユニットに結合部位をもつことが報告されている。シルニジピンはラット脳膜標本の $[\text{H}]-\omega$ -コノトキシン結合を $10 \mu\text{M}$ で約 25%抑制する程度であり²³⁾、シルニジピンのN型 Ca^{2+} チャンネルに対する結合部位は ω -コノトキシンと異なると推測される。クロルプロマジンなどのドパミン受容体拮抗薬もN型 Ca^{2+} チャンネルを阻害し、 Ba^{2+} 電流の不活性化を促進させると報告されている³⁹⁾。一方、シルニジピンは不活性化に殆ど影響を与えないことから、ドパミン受容体拮抗薬とも結合部位が異なる可能性が考えられる。

シルニジピンはL型 Ca^{2+} 電流を抑制することが単離血管平滑筋細胞において報告されている³⁵⁾。また、シルニジピンは Ca^{2+} 電流のL型成分とN型成分の両方を抑制し、その力価は両者でほぼ同程度であることも報告されている¹⁶⁾。したがって、シルニジピンはL型とN型の両チャンネルに作用するため、血管拡張作用と交感神経抑制作用を同時に引き起こすことが可能と考えられる。

シルニジピンは麻酔イヌにおいて交感神経刺激による腎血管収縮や抗ナトリウム利尿を抑制した(本章第2および第3節)。腎臓は交感神経に支配される臓器であり、腎神経刺激による腎機能変化はアドレナリン α_1 受容体を介して誘起され⁶⁾、L型カルシウム拮抗薬のベラパミルやニフェジピンは腎神経刺激による腎血管収縮を抑制しない^{25,33)}ことが報告されている。また、腎神経刺激による抗ナトリウム利尿作用もL型カルシウム拮抗薬に抵抗性である^{26,32)}。このため、神経終末からのノルエピネフリン放出機構とアドレナリン α_1 受容体以降の生理作用発現機構にL型 Ca^{2+} チャンネルの寄与はないと考えられている。ところが、シルニジピンは高頻度腎神経刺激による腎血管収縮と低頻度腎神経刺激による抗ナトリウム利尿を抑制することが本研究で明らかとなった。このとき、シルニジピンは低頻度腎神経刺激によるノルエピネフリン放出反応を抑制した。シルニジピンはアドレナリン α_1 受容体に結合しないことも確認されており²³⁾、N型 Ca^{2+} チャンネル阻害作用によりノルエピネフリン放出抑制を介して交感神経性腎機能調節を修飾することが明らかになった。シルニジピンが交感神経抑制作用を示す用量でL型カルシウム拮抗薬と同様な腎血流増加、ナトリ

ウム利尿作用、外因性ノルエピネフリンまたはアンジオテンシンIIによる腎血管収縮の抑制作用も示したことから、シルニジピンは腎臓においてL型とN型の両 Ca^{2+} チャンネルに作用して腎機能を修飾することが明らかになった。

シルニジピンは抗高血圧薬として臨床応用され、寒冷ストレスによる血圧上昇を抑制するという成績が基礎および臨床の研究により得られている^{22,41)}。この抑制効果は他のカルシウム拮抗薬には見られないシルニジピンに特徴的な薬理作用である。この抑制機序を本研究で得られた結果と併せて考察すると、シルニジピンは交感神経終末のN型 Ca^{2+} チャンネルを阻害して、ノルエピネフリン遊離を減弱させることにより寒冷ストレス昇圧を抑制したと考えられる。カルシウム拮抗薬は高血圧症に対して有効性が高いが、交感神経活性亢進の関与した高血圧症に対し降圧効果が期待されにくい。しかし、シルニジピンはこのような高血圧症に対しても降圧効果が期待されるため、高血圧治療薬として有用と考えられる。

交感神経機能の亢進は循環器疾患のさまざまな病態に関与していると考えられている。冠動脈疾患では交感神経機能亢進が心筋虚血や期外収縮の増悪に関与しており、心不全患者の生命予後は血漿ノルアドレナリン濃度の高い例で不良である。カルシウム拮抗薬は虚血性心疾患の治療に用いられてきた。カルシウム拮抗薬は異型狭心症や労作性狭心症には有用性が高いが、心筋梗塞や虚血性心疾患を伴う心不全には満足な結果が得られていない。特にニフェジピンは急激な血圧低下に伴い交感神経系やレニン-アンジオテンシン系を活性化することが知られており、この作用が治療効果に悪影響を及ぼすと考えられている。シルニジピンは緩徐に血圧を低下させ²¹⁾、さらにN型カルシウム拮抗作用に基づく交感神経機能抑制があるため、虚血性心疾患などの循環器疾患に対し有望な薬剤になることが期待できる。

第5章 総括

麻酔下イヌで、アンジオテンシン II または交感神経系による腎機能変化に対するカルシウム拮抗薬および細胞内カルシウム遊離阻害薬の影響を検討し、以下の結果を得た。

- ・アンジオテンシン II による腎血管収縮に対するカルシウム拮抗薬 CD-349、 Ca^{2+} チャンネル活性化薬 Bay K 8644 および細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の影響を検討した。その結果、アンジオテンシン II による腎血管収縮は CD-349 と TMB-8 で抑制され、Bay K 8644 で促進された（第1章）。
- ・アンジオテンシン II による腸間膜血管収縮に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンおよび細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の影響を検討した。その結果、アンジオテンシン II による腸間膜血管収縮は TMB-8 で抑制されたが、ニフェジピンでは影響されなかった（第2章第1節）。
- ・アンジオテンシン II 静脈内投与による腎血管と腸間膜血管収縮および昇圧に対するカルシウム拮抗薬ニフェジピンまたは細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の静脈内投与の影響を検討した。その結果、TMB-8 はアンジオテンシン II による腎血管と腸間膜血管収縮を抑制したが、ニフェジピンは腎血管収縮のみを抑制し、腸間膜血管収縮と昇圧にほとんど影響を与えなかった（第2章第2節）。
- ・細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の尿生成機構に与える作用を検討した。その結果、TMB-8 は腎血行動態を変化させることなくナトリウム利尿作用を誘発することが示された（第3章第1節）。
- ・カルシウム拮抗薬ニフェジピンおよび細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 のナトリウム利尿作用に対するアンジオテンシン II の影響を検討した。その結果、ニフェジピンおよび TMB-8 のナトリウム利尿作用はアンジオテンシン II 存在下で増強されることが示された（第3章第2節）。
- ・カルシウム拮抗薬ニフェジピンおよび細胞内カルシウム遊離阻害薬 TMB-8 の腎アンジオテンシン II 受容体に対する親和性を検討した。その結果、ニフェジピンと TMB-8 は 10^{-5}M までアンジオテンシン II 受容体に親和性を示さなかった（第3章第3節）。

- ・カルシウム拮抗薬シルニジピンの N 型 Ca^{2+} チャンネルに対する作用を単離交感神経節細胞でパッチクランプ法により検討した。その結果、シルニジピンは N 型 Ca^{2+} 電流を濃度依存的に抑制した。その力価は、シルニジピン>フルナリジン>ジルチアゼム>ベラパミル>ニフェジピンの順であった（第4章第1節）。
- ・高頻度腎神経刺激による腎血管収縮に対するカルシウム拮抗薬シルニジピンの影響を検討した。その結果、シルニジピンは腎神経刺激による腎血管収縮を抑制することが示された（第4章第2節）。
- ・低頻度腎神経刺激による抗ナトリウム利尿とノルエピネフリン放出に対するカルシウム拮抗薬シルニジピンの影響を検討した。その結果、シルニジピンは腎神経刺激による抗ナトリウム利尿とノルエピネフリン放出を抑制することが示された（第4章第3節）。

これらの結果により以下のことが示唆された。

- ・カルシウム拮抗薬はアンジオテンシン II による腸間膜血管収縮と血圧上昇に比べ腎血管収縮を選択的に抑制し、腎血管ではアンジオテンシン II による血管収縮における細胞外 Ca^{2+} 流入の依存度が腸間膜血管を含めた他の血管に比べ大きい。
- ・細胞内カルシウム遊離阻害薬はアンジオテンシン II による腎血管収縮と腸間膜血管収縮とともに抑制し、両血管の収縮発現に細胞内 Ca^{2+} 遊離が関与している。
- ・細胞内カルシウム遊離阻害薬がナトリウム利尿作用を示すことから、細胞内 Ca^{2+} 遊離機構が腎尿細管細胞の Na^{+} 再吸収過程に関与している。
- ・カルシウム拮抗薬と細胞内カルシウム遊離阻害薬はアンジオテンシン II による抗ナトリウム利尿に拮抗し、抗ナトリウム利尿作用発現時に Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離の両者が関与している。
- ・カルシウム拮抗薬シルニジピンは交感神経細胞の N 型 Ca^{2+} チャンネルを阻害する。
- ・腎機能調節機構には交感神経 N 型 Ca^{2+} チャンネルが介在し、カルシウム拮抗薬シルニジピンは腎神経終末からのノルエピネフリン放出抑制により交感神経による腎血行動態変化や尿生成に影響を与える。

謝 辞

本研究に際し御指導と御鞭撻を賜りました恩師、東北大学薬学部薬理学講座教授 佐藤進先生に謹んで感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、幾多の有益な御助言、御指導を賜りました東北大学薬学部生化学講座教授 大内和雄先生、同衛生化学講座教授 山添康先生に厚く御礼申し上げます。

また、有益な御助言、御協力を賜りました東北大学薬学部薬理学講座比佐博彰助教授、草場美津江博士ならびに教室員の皆様と味の素株式会社橋本重文博士、吉元良太博士、近藤信雄博士、畝山寿之博士に感謝いたします。

引 用 文 献

1. Abe, Y., T. Komori, K. Miura, T. Takeda, M. Imanishi, T. Okahara, and K. Yamamoto. Effects of the calcium antagonist nicardipine on renal function and renin release in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: 254-259, 1983.
2. Aperia, A., U. Holtback, M.L. Syren, L.B. Svensson, J. Fryckstedt, and P. Greengard. Activation/deactivation of renal Na^+, K^+ -ATPase: A final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J.* 8: 436-439, 1994.
3. Asano, M., K. Aoki, Y. Suzuki, and T. Matsuda. Effects of Bay k 8644 and nifedipine on isolated dog cerebral, coronary and mesenteric arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 646-656, 1987.
4. Bell, A.J., and A. Lindner. Effects of verapamil and nifedipine on renal function and hemodynamics in the dog. *Renal Physiol.* 7: 329-343, 1984.
5. Benabe, J.E., L.A. Spry and A.R. Morrison. Effects of angiotensin II on phosphatidylinositol and polyphosphoinositides turnover in rat kidney. *J. Biol. Chem.* 257: 7430-7434, 1982.
6. Chiba, K., Y. Hayashi, H. Hisa, M. Kusaba-Suzuki, and S. Satoh. Effects of a novel α_1 -adrenoceptor antagonist, SGB-1534, on adrenergically induced renal vasoconstriction in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 263-269, 1990.
7. Chiou, C.Y., and M.H. Malagodi. Studies on the mechanism of action of a new Ca^{2+} antagonist, 8-(N,N-diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br. J. Pharmacol.* 53: 279-285, 1975.

8. Cooper, C.L., and K.U. Malik. Mechanism of action of vasopressin on prostaglandin synthesis and vascular function in the isolated rat kidney: Effect of calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: 139-147, 1984.
9. Cooper, C.L., J.E. Shaffer, and K.U. Malik. Mechanism of action of angiotensin II and bradykinin on prostaglandin synthesis and vascular tone in the isolated rat kidney. *Circ. Res.* 56: 97-108, 1985.
10. DiBona, G.F., and U.C. Kopp. Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 77: 75-197, 1997.
11. DiBona, G.F., and L.L. Sawin. Renal tubular site of action of felodipine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 420-424, 1984.
12. Donowitz, M., S. Cusolito, and G.W.G. Sharp. Effects of calcium antagonist TMB-8 on active Na and Cl transport in rabbit ileum. *Am. J. Physiol.* 250: G691-G697, 1986.
13. Dozen, M., K. Watanabe, M. Hosono, and Y. Hayashi. Effects of cilnidipine on renal function in SHR and endothelin-induced renal dysfunction. *Folia Pharmacol. Jpn.* 107: 79-89, 1996.
14. Edwards, R.M., E.J. Stack, E.F. Weidley, N. Aiyar, R.M. Keenan, D.T. Hill and J. Weinstock. Characterization of renal angiotensin II receptors using subtype selective antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260: 933-938, 1992.
15. Fleckenstein, A. Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17: 149-166, 1977.

16. Fujii, S., K. Kameyama, M. Hosono, Y. Hayashi, and K. Kitamura. Effect of cilnidipine, a novel dihydropyridine Ca^{++} -channel antagonist, on N-type Ca^{++} channel in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 1184-1191, 1997.
17. Hall, J.E. Control of sodium excretion by angiotensin II: Intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am. J. Physiol.* 250: R960-R972, 1986.
18. Hamil, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patch. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 391: 85-100, 1981.
19. Hess, P., J.B. Lansman, and R.W. Tsien. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature (London)* 311: 538-544, 1984.
20. Hirning, L.D., A.P. Fox, E.W. McCleskey, B.M. Olivera, S.A. Thayer, R.J. Miller, and R.W. Tsien. Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239: 57-61, 1988.
21. Hosono, M., M. Dozen, T. Hiruma, S. Fujii, K. Watanabe, and Y. Hayashi. Changes in heart rate and plasma norepinephrine level of conscious spontaneously hypertensive rats treated with cilnidipine (FRC-8653). *Jpn. Pharmacol. Ther.* 23: 3029-3040, 1995.
22. Hosono, M., T. Hiruma, K. Watanabe, Y. Hayashi, H. Ohnishi, Y. Takata, and H. Kato. Inhibitory effect of cilnidipine on pressor response to acute cold stress in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 69: 119-125, 1995.

23. Hosono, M., S. Fujii, T. Hiruma, K. Watanabe, Y. Hayashi, H. Ohnishi, Y. Takata, and H. Kato. Inhibitory effect of cilnidipine on vascular sympathetic neurotransmission and subsequent vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 69: 127-134, 1995.
24. Imagawa, J., H. Kurosawa, and S. Satoh. Effects of nifedipine on renin release and renal function in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8: 636-640, 1986.
25. Imagawa, J., M. Kusaba-Suzuki, and S. Satoh. Preferential inhibitory effect of nifedipine on angiotensin II-induced renal vasoconstriction. *Hypertension* 8: 897-903, 1986.
26. Kadowitz, P.J., W.M. Armstead, P.Y. Roland, A.L. Hyman and H.L. Lipton. Inhibitory effects of diltiazem on vasoconstrictor responses in the cats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244: 84-90, 1988.
27. Johns, E.J., and J. Manitus. A study in the rat of renal actions of nitrendipine and diltiazem on the adrenergic regulation of calcium and sodium reabsorption. *Br. J. Pharmacol.* 89: 99-107, 1986.
28. Kageyama, M., Y. Matsumura, K. Hayashi, T. Hosokawa, and S. Morimoto. Inhibitory effects of nisoldipine and saralasin on angiotensin II-induced antidiuresis in anesthetized dogs. *Jpn. J. Pharmacol.* 52: 245-253, 1990.
29. Keiser, J.A., F.A. Bjork, J.C. Hodges, and D.G. Taylor, Jr. Renal hemodynamic and excretory responses to PD 123319 and losartan, nonpeptide AT₁ and AT₂ subtype-specific angiotensin II ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 1154-1160, 1992.
30. Kojima, I., K. Kojima, and H. Rasmussen. Mechanism of inhibitory action of TMB-8 [8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride] on aldosterone secretion in adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J.* 232: 87-92, 1985.
31. Murase, K., M. Randic, T. Shirasaki, T. Nakagawa, and N. Akaike. Serotonin suppresses N-methyl-D-aspartate response in acutely isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res.* 525: 84-91, 1990.
32. Ogasawara, A., H. Hisa, and S. Satoh. An intracellular calcium release inhibitor TMB-8 suppresses renal nerve stimulation-induced antinatriuresis in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 117-121, 1993.
33. Ogawa, N., H. Kushida, and S. Satoh. Effect of verapamil on renal vasoconstriction induced by angiotensin II, norepinephrine or renal nerve stimulation in anesthetized dogs. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 268: 113-121, 1984.
34. Ogawa, N., and H. Ono. Effect of 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB-8), an inhibitor of intracellular Ca²⁺ release, on autoregulation of renal blood flow in the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338: 293-296, 1988.
35. Oike, M., Y. Inoue, K. Kitamura, and H. Kuriyama. Dual action of FRC8653, a novel dihydropyridine derivative, on the Ba²⁺ current recorded from the rabbit basilar artery. *Cir. Res.* 67: 993-1006, 1990.
36. Olsen, M.E., J.E. Hall, J.-P. Montani, A.C. Guyton, H.G. Langford, and J.E. Cornell. Mechanisms of angiotensin II natriuresis and antinatriuresis. *Am J. Physiol.* 249: F299-F307, 1985.

37. Roe, M.W., J.R. Hepler, T.K. Harden, and B. Herman. Platelet-derived growth factor and angiotensin II cause increases in cytosolic free calcium by different mechanisms in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 139: 100-108, 1989.
38. Roy, M.W., G.P. Guthrie, F.P. Holladay, and T.A. Kotchen. Effects of verapamil and nifedipine on renin and aldosterone in the dog and rat. *Am. J. Physiol.* 245: E410-E416, 1983.
39. Sah, D.W., and B.P. Bean. Inhibition of P-type and N-type calcium channels by dopamine receptor antagonists. *Mol. Pharmacol.* 45: 84-92, 1994.
40. Saida, K. and C. van Breemen. A possible Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mechanism mediated by norepinephrine in vascular smooth muscle. *Pflügers. Arch. Eur. J. Physiol.* 397: 166-167, 1983.
41. Saihara, S., M. Sumio, M. Hosono, Y. Hayashi, Y. Kitamura and S. Hashimoto. Effect of FRC-8653 (Cilnidipine) on blood pressure changes during the cold pressor test. *Jpn. Pharmacol. Ther.* 21: 271-276, 1993.
42. Schramm, M., G. Thomas, R. Towart, and G. Franckowiak. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. *Nature (London)* 303: 535-537, 1983.
43. Takagi, H., A. Takahara, Y. Tomura, T. Yamagata, H. Hisa, and S. Satoh. Effects of nifedipine, 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride and atrial natriuretic peptide on endothelin-induced antinatriuresis in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267: 456-461, 1993.
44. Takeda, K., H. Meyer-Lehnert, J. K. Kim, and R. W. Schrier. Effect of angiotensin II on Ca^{2+} kinetics and contraction in cultured rat glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 254: F254-F266, 1988.
45. Taub, K.J., W.J. Caldicott and N.K. Hollenberg. Angiotensin antagonists with increased specificity for the renal vasculature. *J. Clin. Invest.* 59: 528-535, 1979.
46. Troyer, D.A., J.I. Kreisberg, D.W. Schwartz and M.A. Venkatachalam. Effects of vasopressin on phosphoinositides and prostaglandin production in cultured mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 249: F139-F147, 1985.
47. Tsuchida, K., R. Yamazaki, K. Kaneko, and H. Aihara. Effects of the new calcium antagonist 2-nitratopropyl-3-nitratopropyl-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate on cerebral circulation in dogs. *Arzeim.-Forsch./Drug Res.* 37 (II): 1239-1243, 1987.
48. Uneyama, H., C. Uneyama, and N. Akaike. Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca^{2+} oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.* 268: 168-174, 1993.
49. van Heiningen, P.N., H.D. Batink, and P.A. van Zwieten. Angiotensin II-induced increase in slowly exchanging $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in relation to contractile responses of rat and guinea-pig aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344: 107-113, 1991.
50. Yamaguchi, I., K. Ikezawa, T. Takada, and A. Kiyomoto. Studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative (CRD-401) VI. Effects on renal blood flow and renal function. *Jpn. J. Pharmacol.* 24: 511-522, 1974.

51. Zhou, J., P.J. Harris, and S.L. Skinner. Modulation of proximal tubular reabsorption by angiotensin II. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 13: 277-281, 1986.

